



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Ledić Drvar, Daniela (2014) *Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze, faktora proliferacije Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože [Expression of transmembrane receptors of tyrosine kynase, proliferation marker Ki67 and protein p53 in cutaneous squamous cell carcinoma]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2163>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Daniela Ledić Drvar**

**Izraženost transmembranskih  
receptora tirozin kinaze, faktora  
proliferacije Ki67 i proteina p53 u  
planocelularnom karcinomu kože**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2014.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Daniela Ledić Drvar**

**Izraženost transmembranskih  
receptora tirozin kinaze, faktora  
proliferacije Ki67 i proteina p53 u  
planocelularnom karcinomu kože**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2014.**

Disertacija je izrađena u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te na Zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Zrinka Bukvić Mokos

*Nemoguće je nabrojati sve dobre ljude koji su doprinijeli nastanku ove disertacije. Svima im se od srca zahvaljujem.*

*Međutim, nekoliko je osoba kojima se želim posebno zahvaliti.*

*Prof.dr.sc. Jasni Lipozenčić, Predsjednici AMZH, koja mi je svesrdno pomagala u tijeku izrade disertacije, bodrila me i poticala da idem dalje.*

*Mojoj mentorici, doc.dr.sc. Zrinki Bukvić Mokos, koja je pedantno i sistematično, s prijateljskom naklonošću sudjelovala u stvaranju rada.*

*Predstojnici Klinike za dermatovenerologiju prof.dr.sc. Branki Marinović koja je bila podrška cijelo vrijeme izrade disertacije.*

*Doc.dr.sc. Ivani Ilić, sa Zavoda za patologiju KBC Zagreb, koja je uložila ogroman trud u patohistološku i imunohistokemijsku analizu uzoraka i uvijek bila spremna za prijateljski savjet, unatoč svim drugim obvezama.*

*Mojoj obitelji koja je uvijek uz mene.*

*Mojoj majci koja s ljubavlju prati moj život i rad.*

*Suprugu Željku koji je uz mene u svim važnim trenucima uvijek pun ljubavi i razumijevanja.*

*Nećaku Luki na kojega se uvijek mogu osloniti.*

*Dr Daniela Ledić Drvar*

# SADRŽAJ

## POPIS KRATICA

## POPIS SLIKA

## POPIS TABLICA

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. TEMELJNE ODREDNICE .....	2
1.2. PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE .....	4
1.3 RECEPTORI TIROZIN KINAZE .....	11
1.3.1. EGFR (HER1).....	12
1.3.2. HER2.....	13
1.3.3.HER3.....	13
1.3.4. HER4.....	13
1.3.5. Dosadašnja istraživanja RTK u karcinomima kože .....	14
1.3.6. Aktualna primjena anti-HER terapije danas: .....	15
1.4. PROTEIN p53 .....	16
1.5. Ki67.....	18
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>19</b>
<b>3. CILJ RADA.....</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>23</b>
4.1. MATERIJALI .....	24
4.2. METODE .....	25
4.2.1. Histološka analiza .....	25
4.2.2. Imunohistokemijske metode .....	25
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1. Opis ispitivanog uzorka.....</b>	<b>29</b>
5.1.2. Raspodjela ispitanika prema dobi .....	30

5.1.3. Raspodjela ispitanika prema spolu.....	31
5.1.4. Raspodjela ispitanika prema broju tumora (solitarni/multipli) .....	32
5.1.5. Raspodjela ispitanika prema fototipu kože, izloženosti UV zračenju i sunčevim opeklinama u djetinjstvu .....	33
5.1.6. Raspodjela ispitanika prema lokalizaciji tumora .....	36
5.1.7. Raspodjela uzoraka prema patohistološkom stupnju tumora.....	37
5.2. Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu .....	38
5.2.1. Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.....	49
5.3. Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože u odnosu na multipli planocelularni karcinom .....	57
5.4. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s pojavom multiplih tumora kože, fototipom kože, te anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju i broju sunčevih opeklinu u djetinjstvu.....	62
5.4.1. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s Ki67 imunoreaktivnošću te izraženošću proteina p53 u solitarnom, multiplom planocelularnom karcinomu, kao i u zdravoj koži.....	62
5.4.2. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože .....	71
5.4.3. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju .....	73
5.4.4. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu .....	75
5.5. Predikcije patohistološkog stupnja tumora (po Brodersu) s obzirom na izraženost pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53 .....	77
5.6. Predikcija rizika nastanka multiplih tumora s obzirom na izraženost pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53 te pojedine anamnestičke podatke.....	78
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>79</b>

<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>90</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>92</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>94</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>96</b>
<b>11. BIOGRAFIJA .....</b>	<b>105</b>
<b>UPITNIK</b>	

## POPIS KRATICA

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> = Američko udruženje za rak
AK	aktinička keratoza
BCC	<i>basal cell carcinoma</i> = bazocelularni karcinom
CISH	kromogena <i>in situ</i> hibridizacija
COX-2	ciklooksigenaza 2 (enzim)
cSCC	<i>Cutaneous squamous cell carcinoma</i> = kožni planocelularni karcinom
DFS	<i>disease free survival</i> = preživljenje bez bolesti
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> = čimbanik epidermalnog rasta
ER	estrogenski receptori
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i> = humani čimbanik epidermalnog rasta
HPV	<i>Human papilloma virus</i> = ljudski papilomavirus
<i>ING family</i>	<i>inhibitor of growth family</i> = obitelj inhibicije rasta
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> = mitogen-aktivirajuća protein kinaza
MB	<i>Morbus Bowen</i> = Bowenova bolest; neinvazivni planocelularni karcinom
<i>mRNA</i>	<i>messenger ribonucleic acid</i> = glasnička ribonukeleinska kiselina
NMSC	<i>nonmelanoma skin cancer</i> = nemelanomski karcinom kože
<i>OS</i>	<i>overall survival</i> = ukupno preživljenje
p53	„čuvar genoma“; „divlji“ p53; tumor supresor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = reakcija lančanom polimerazom
PR	progesteronski receptori
RTK	receptori tirozin kinaze
RT-PCR vremenu	<i>real time</i> PCR = PCR (reakcija lančanom polimerazom) u realnom
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> = planocelularni karcinom



## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Klinički izgled planocelularnog karcinoma.....	7
<b>Slika 2.</b> Klinička slika lokalno uznapredovalog planocelularnog karcinoma kože. ....	8
<b>Slika 3.</b> Patohistološka slika planocelularnog karcinoma kože (H&E x40). ....	9
<b>Slika 4.</b> Patohistološka slika planocelularnog karcinoma kože (H&E x40). ....	9
<b>Slika 5.</b> Patohistološka slika planocelularnog karcinoma kože (H&E x40). ....	10
<b>Slika 6.</b> Raspodjela ispitivane skupine prema dobi. ....	30
<b>Slika 7.</b> Raspodjela ispitivane skupine prema spolu. ....	31
<b>Slika 8.</b> Raspodjela ispitivane skupine prema broju tumora. ....	32
<b>Slika 9.</b> Raspodjela ispitivane skupine prema fototipu kože. ....	33
<b>Slika 10.</b> Raspodjela ispitivane skupine prema UV zračenju tijekom života. ....	34
<b>Slika 11.</b> Raspodjela ispitivane skupine prema broju sunčevih opeklinu u djetinjstvu. ....	35
<b>Slika 12.</b> Raspodjela ispitivane skupine prema lokalizaciji tumora. ....	36
<b>Slika 13.</b> Raspodjela uzoraka prema patohistološkom stupnju tumora. ....	37
<b>Slika 14.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti EGFR u planocelularnom karcinomu kože. ....	38
<b>Slika 15.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti EGFR u zdravoj koži. ....	39
<b>Slika 16.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti HER2 u planocelularnom karcinomu kože. ....	40
<b>Slika 17.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti HER2 u zdravoj koži. ....	41
<b>Slika 18.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti HER3 u planocelularnom karcinomu kože. ....	42
<b>Slika 19.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti HER3 u zdravoj koži. ....	43
<b>Slika 20.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti biljega proliferacije Ki67u planocelularnom karcinomu kože. ....	44
<b>Slika 21.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti biljega proliferacije Ki67 u zdravoj koži. ....	45
<b>Slika 22.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti proteina p53u planocelularnom karcinomu kože. ....	46
<b>Slika 23.</b> Imunohistokemijska analiza izraženosti proteina p53u zdravoj koži. ....	47
<b>Slika 24.</b> Usporedba izraženosti EGFR u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu. ....	50

<b>Slika 25.</b> Usporedba izraženosti biljega proliferacije Ki67 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.....	51
<b>Slika 26.</b> Usporedba izraženosti p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.....	52
<b>Slika 27.</b> Usporedba izraženosti biljega Ki67 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu. ....	54
<b>Slika 28.</b> Usporedba izraženosti proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu. ....	56
<b>Slika 29.</b> Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR) u solitarnom i multiplom planocelularnom karcinomu kože. ....	59
<b>Slika 30.</b> Usporedba izraženosti biljega Ki67 u solitarnom i multiplom planocelularnom karcinomu kože.....	60
<b>Slika 31.</b> Usporedba izraženosti proteina p53 u solitarnom i multiplom planocelularnom karcinomu kože.....	61
<b>Slika 32.</b> Povezanost izraženosti EGFR (%) i Ki67 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.....	62
<b>Slika 33.</b> Povezanost izraženosti EGFR (%) i p53 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.....	63
<b>Slika 34.</b> Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i Ki67 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.....	64
<b>Slika 35.</b> Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i p53 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.....	65
<b>Slika 36.</b> Povezanost izraženosti EGFR (%) i Ki67 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.....	66
<b>Slika 37.</b> Povezanost izraženosti EGFR (%) i p53 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.....	67
<b>Slika 38.</b> Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i Ki67 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.....	68
<b>Slika 39.</b> Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i p53 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.....	69
<b>Slika 40.</b> Povezanost izraženosti EGFR s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu.....	76

## POPIS TABLICA

<b>Tablica 1.</b> Tipovi kože po Fitzpatrick-u i sur. prema osjetljivosti na ultraljubičaste zrake (3). .....	5
<b>Tablica 2.</b> Čimbenici rizika za nastanak planocelularnog karcinoma kože, prema Fitzpatrick i sur.(3). .....	6
<b>Tablica 3.</b> Procjena pozitivnosti za HER-2. ....	26
<b>Tablica 4.</b> Opis ispitivanog uzorka (N=101). ....	29
<b>Tablica 5.</b> Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože i zdravoj koži. ....	48
<b>Tablica 6.</b> Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR i HER3), .....	48
<b>Tablica 7.</b> Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu: Mann-Whitney U test. ....	49
<b>Tablica 8.</b> Usporedba izraženosti biljega Ki67 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu: hi kvadrat test. ....	53
<b>Tablica 9.</b> Usporedba izraženosti proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu: hi kvadrat test .....	55
<b>Tablica 10.</b> Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože između multiplog i solitarnog planocelularnog karcinoma: Mann-Whitney U test.....	57
<b>Tablica 11.</b> Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože između multiplog i solitarnog planocelularnog karcinoma: hi kvadrat test. ....	58
<b>Tablica 12.</b> Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s nuklearnom, membranskom i citoplazmatskom Ki67 imunoreaktivnošću te izraženošću proteina p53 u solitarnom, multiplom planocelularnom karcinomu, kao i u zdravoj koži*. ....	70
<b>Tablica 13.</b> Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože: Mann-Whitney U test.....	71

<b>Tablica 14.</b> Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože: hi kvadrat test. ....	72
<b>Tablica 15.</b> Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju: Mann-Whitney U test. ....	73
<b>Tablica 16.</b> Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju: hi kvadrat test. ....	74
<b>Tablica 17.</b> Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu: Mann-Whitney U test. ....	75
<b>Tablica 18.</b> Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu: hi kvadrat test. ....	76
<b>Tablica 19.</b> Regresijski model predikcije patohistološkog stupnja tumora (po Brodersu) s obzirom na izraženosti pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53. ....	77
<b>Tablica 20.</b> Regresijski model predikcije rizika nastanka multiplih tumora s obzirom na izraženosti pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53 te pojedine anamnestičke podatke: binarna logistička regresija. ....	78
<b>Tablica 21.</b> Usporedba do sada objavljenih istraživanja obitelji HER-receptora u koži i našeg istraživanja. ....	84



Zadnjih nekoliko desetljeća zamijećena je povećana učestalost tumora općenito, osobito tumora kože. Danas kožni tumori predstavljaju značajan javnozdravstveni problem u Hrvatskoj i svijetu.

Znatni naponi se ulažu u proučavanje biologije tumora kako bi se spoznalo više o nastanku, a time i mogućnostima liječenja tumora.

Rezultat novih spoznaja u molekularnoj biologiji nastanka tumora je i pronalazak ciljanih lijekova.

Douglas Hanah i Robert A. Weinberg (2011.) saželi su obilježja koja su zajednička svim tipovima zloćudnih tumora: samodostatnost s obzirom na signale rasta, neosjetljivost na signale koji inhibiraju rast, zaobilazanje programirane stanične smrti (apoptoze), neograničen potencijal umnažanja, tumorska angiogeneza, sposobnost tkivne invazije i presađivanja, poremećen metabolizam, sposobnost izbjegavanja imunskog odgovora, genomska nestabilnost i upala (1).

U nastanku tumora važnu ulogu imaju onkogeni i tumorsupresorski geni.

Onkogeni su geni koji imaju središnju ulogu u nastanku karcinoma. Oni su promijenjena inačica normalnih staničnih gena koji se nazivaju proto-onkogeni i sudjeluju u regulaciji normalne stanične proliferacije i diferencijacije. Aktivacija onkogeni nastaje na nekoliko načina. Može nastati kao posljedica genske amplifikacije odnosno povećanja broja gena, kao u slučaju onkogeni ERBB2 (HER2), ili kao posljedica kromosomske translokacije (2). Tumorsupresorski geni su geni čija mutacija, inaktivacija ili gubitak obično ima recesivni učinak, nužna je inaktivacija obaju alela da bi se očitovao njihov učinak. Važan tumorsupresorski gen je p53. Aktivirani p53 ima dva osnovna načina djelovanja: zaustavlja stanicu u određenoj fazi staničnog ciklusa i aktivira popravak oštećenja DNA te potiče apoptozu. Inaktivacija p53 u stanicama raka povezana je i s tumorskom angiogenezom te rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju (2).

## 1.1. TEMELJNE ODREDNICE

### Planocelularni karcinom kože

Planocelularni karcinom kože (SCC - *squamous cell carcinoma*) je maligni tumor koji nastaje iz epidermalnih keratinocita. Zajedno s bazocelularnim karcinomom (BCC- *basal cell carcinoma*) predstavlja nemelanomske tumore kože (NMSC – *nonmelanoma skin cancer*) koji su najčešći maligni tumori u ljudi (3).

U etiopatogenezi važnu ulogu imaju slijedeći čimbenici rizika: genetski čimbenici, svijetli tip kože, UV zračenje, kronični degenerativni i upalni procesi, kemijski čimbenici, onkogeni virusi, imunosupresija, ionizirajuće zračenje, te životne navike (3). Smatra se da se lokalne i

udaljene metastaze pojavljuju u oko 5% -12% slučajeva. Postotak metastaziranja je i viši u visoko rizičnih planocelularnih karcinoma (4-7).

Imunosuprimirani bolesnici, osobito oni nakon transplantacije solidnih organa, prvenstveno srca, potom bubrega a manje jetre, imaju znatno veći rizik za nastanak planocelularnog karcinoma kože (8).

Budući s razvojem i napretkom medicine u populaciji raste broj bolesnika koji se liječe imunosupresivima, moramo biti svjesni rizika takve terapije.

Kako se radi o tumorima koji su često multipli te rezistentni na terapiju, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se omogućila ciljana terapija.

### **HER obitelji receptora**

Obitelj HER receptora (*Human epidermal growth factor receptor*) nadzire brojne signalne puteve (9).

Neodgovarajuća aktivacija HER signalnog puta povezana je s nastankom brojnih vrsta tumora: karcinoma dojke, karcinoma pluća ne-malih stanica, karcinoma jajnika, karcinoma pankreasa, karcinoma prostate, karcinoma glave i vrata te glioblastoma (10-15).

HER signalni put uključuje: vezanje liganda, dimerizaciju receptora, aktivaciju tirozin-kinaza domene, te nizvodne signalne molekule (9,16).

Budući je HER signalni put uključen u nastanak karcinoma, predstavlja i cilj za terapijske učinke. Nekoliko je strategija za djelovanje na HER signalni put i uključuje djelovanje na: ligande, domenu ekstracelularnog receptora (aktivacija i dimerizacija), intracelularnu domenu receptora (tirozin kinaza), nizvodne signalne molekule (9, 17, 18).

### **P53**

Inaktivacija p53 dovodi do destabilizacije genoma u cjelosti. Inaktivira se “točkastom” mutacijom. Mutacije gena za p53 prisutne su u više od 50% svih bazocelularnih i planocelularnih karcinoma kože. Mutirani p53 gen nije funkcionalan, te je izgubljena njegova zaštitna funkcija uvođenja oštećene stanice u apoptozu što pridonosi preživljavanju abnormalnih stanica. Imunohistokemijska analiza izraženosti p53 smatra se korisnim pokazateljem njegovih mutacija.

Za planocelularni karcinom je utvrđena mutacija p53 u >90% slučajeva (19-22).

### **Ki67**

Ki67 proliferacijski indeks mjeri količinu jezgrinog antigena Ki67 koji je smješten na dugom kraku kromosoma 10. Izraženost tog gena u razmjeru je s drugim biljezima proliferacije kao što su udio stanica u S- fazi. Visoki Ki67 indeks znak je loše prognoze, a povezan je s mogućim dobrim odgovorom na kemoterapiju (23).

Novija istraživanja otkrivaju membransku i citoplazmatsku aktivnost Ki67 (24).

Dosadašnja istraživanja HER obitelji u karcinogenezi planocelularnog karcinoma kože nisu dovela do konkretnih zaključaka o njihovoj ulozi.

## 1.2. PLANOCELULARNI KARCINOM KOŽE

Sinonimi: *Carcinoma planocellulare*, *Squamous cell carcinoma* (SCC), *Cutaneous squamous cell carcinoma* (cSCC) (25,26).

Drugi je po učestalosti maligni tumor kože i sluznica. Planocelularni karcinom je građen od atipičnih keratinocita i može se pojaviti u *in situ* ili invazivnom obliku. Nastaje u epidermisu, adneksima kože te u sluznicama koje imaju sposobnost orožnjavanja (3).

### Epidemiološki podaci

Pojava planocelularnog karcinoma povezana je sa starijom životnom dobi a nagli porast incidencije bilježi se u osoba starijih od 40 godina života. Smatra se da je danas rizik za nastanak ovog karcinoma tijekom života u bijelaca oko 15%, što je gotovo dvostruko više nego prije 20 godina. Najvjerojatnije su tome razlog povećana ekspozicija UV zračenju (izlaganje umjetnim izvorima UV svjetla u „salonima za sunčanje“, provođenje više vremena na otvorenom, promjene u načinu odijevanja, te ozonske „rupe“) kao i duže trajanje života. Bitno je naglasiti da nakon postavljene dijagnoze planocelularnog karcinoma bolesnik ima kumulativni rizik za razvoj drugog nemelanomskog tumora kože od 44%-50% u narednih 3-5 godina. Također ovi bolesnici imaju povećan rizik za nastanak ekstrakutanih karcinoma (3,27).

### Demografske karakteristike

Planocelularni karcinom je gotovo dvostruko češći kod muškaraca u odnosu na žene. Najvjerojatnije se radi o duljoj ekspoziciji UV zračenju tijekom života kod muškaraca. Dulja kosa kao i korištenje ruža za usne, vjerojatno utječu na manju učestalost planocelularnog karcinoma u predjelu uške i usnica u žena (3).



## Etioopatogeneza

Etioopatogenetski čimbenici važni u nastanku planocelularnog karcinoma su brojni i prikazani su u Tablici 1 i 2 (3).

**Tablica 1.** Tipovi kože po Fitzpatrick-u i sur. prema osjetljivosti na ultraljubičaste zrake (3).

Tip kože po Fitzpatrick-u	Odgovor na izlaganje suncu	Primjer	Osjetljivost
I	Uvijek izgori, ne potamni	Svijetla boja kože, svijetle oči ( Kelti)	Vrlo visoka
II	Uvijek izgori, minimalno potamni	Svijetla boja kože, plava kosa, plave oči, (Skandinavci)	Visoka
III	Ponekad izgori, umjereno potamni	Svijetla boja kože, smeđe oči i kosa, neeksponirana koža bijela	Prosječna
IV	Rijetko izgori, lako potamni	Svijetlosmeđa koža, tamnosmeđa kosa, smeđe oči. Neeksponirana koža je preplanule boje. (Mediteranci, hispanoamerikanci)	Niska
V	Rijetko izgori, dobro potamni	Smeđa boja kože, tamniji (Mediteranci, orijentalni narodi, Indijanci)	Vrlo niska
VI	Nikada ne izgori, izrazito pigmentirani	Afroamerikanci	Minimalna

**Tablica 2.** Čimbenici rizika za nastanak planocelularnog karcinoma kože, prema Fitzpatrick i sur.(3).

**Čimbenici rizika za nastanak planocelularnog karcinoma kože**

- Prekursorske lezije (aktinička keratoza, Morbus Bowen)
- Izloženost UV zračenju
- Izloženost ionizirajućem zračenju
- Izloženost karcinogenima iz okoliša
- Imunosupresija
- Ožiljci
- Opekline ili dugotrajna izloženost toplini
- Kronične upalne ili dermatoze koje dovode do nastanka ožiljaka
- Infekcija ljudskim papilomavirusom (HPV)
- Genodermatoze (albinizam, xeroderma pigmentosum, porokeratosis, epidermolysis bullosa)

Za razliku od melanoma i bazocelularnog karcinoma, koji su povezani s intermitentnim izlaganjem UV zračenju (osobito u dječjoj i adolescentnoj dobi), planocelularni karcinom je više povezan s kumulativnim izlaganjem. Karcinom usnice je povezan s cjeloživotnim izlaganjem UV zračenju (28). Osobita opasnost danas prijeti od prekomjernog korištenja salona za sunčanje. To se posebno odnosi na populaciju koja u ranoj odrasloj dobi započne s uporabom (27).

Dok se smatra da bazocelularni karcinom nastaje *de novo*, planocelularni karcinom najčešće nastaje iz prekursorskih lezija kao što su aktinička keratoza (AK) i Morbus Bowen (MB, SCC *in situ*) (3).

### Molekularni aspekti

Kao i kod većine karcinoma nastanak planocelularnog karcinoma kože počinje mutacijama u staničnoj DNA i nestabilnosti genoma. Promjene u ekspresiji gena dovode do gubitka kontrole rasta, prodora kroz bazalnu membranu te u konačnici i do invazije tumora u okolno tkivo. Tijekom nastanka planocelularnog karcinoma, keratinociti postaju otporni na apoptozu i djelovanje imunološkog sustava (3).

Smatra se da su dovoljne dvije mutacije proto-onkogeni da izazovu nastanak planocelularnog karcinoma. Vjerojatni mehanizam nastanka genomske nestabilnosti u keratinocitu posljedica je UVB- inducirane inaktivacije p53, budući oko 58% planocelularnih karcinoma ima mutacije s UVB-potpisom. Nekoliko autora je u svojim radovima potvrdilo prisutnost mutacije p53 u značajnom postotku u planocelularnom karcinomu (29-32).

## Genetske promjene

Većina analiza genetskih promjena u SCC su učinjene u SCC glave, vrata i usne šupljine. Kromosomske delecije (gubitak heterozigotnosti) obično uključuju kromosome 3,9,11, i 17. Najčešće identificirane regije uključuju 9p21 i 17p13 gdje su smješteni INK4A (p16/Arf) i p53 tumor supresor gen (3)

## Klinička obilježja

U kliničkoj slici nalazimo keratotične papule ili noduse, koji mogu ulcerirati (Slika 1).



**Slika 1.** Klinički izgled planocelularnog karcinoma.

Rast planocelularnog karcinoma može biti egzofitičan ili endofitičan, a infiltrat se, u pravilu, otkriva tek palpacijom. SCC pokazuje kliničke znakove malignosti lokalnom destrukcijom okolnih tkiva (Slika 2), mogućnošću recidiva, te sklonošću stvaranja metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (3,25).



**Slika 2.** Klinička slika lokalno uznapredovalog planocelularnog karcinoma kože.

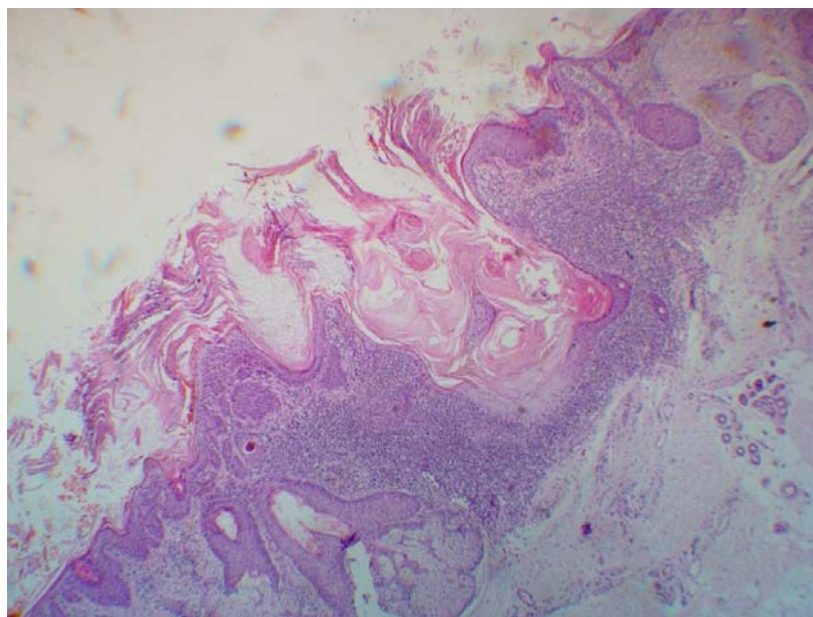
Smatra se da se lokalne i udaljene metastaze pojavljuju u oko 5% -12% slučajeva (4-7). Postotak metastaziranja je i viši u visoko rizičnih planocelularnih karcinoma čija su obilježja: veličina tumora  $> 2\text{cm}$ , debljina tumora  $> 2\text{ mm}$ , Clark  $\geq \text{IV}$ , perineuralna invazija, limfovaskularna invazija, slaba diferencijacija, određeni histološki podtipovi (dezmodoplastični ili adenoskvamozni karcinom, invazivna Bowenova bolest ili SCC nastao na mjestu kronične upale), imunosupresija, HPV infekcija, visoko-rizična anatomska lokalizacija (uška, usnica), izraženost određenih tumorskih gena, ili neadekvatna resekcija tumora.

Obveza je kod svakog bolesnika s planocelularnim karcinomom klinički pregled dostupnih limfnih čvorova, na svakoj kontroli, a po potrebi i daljnja obrada (4).

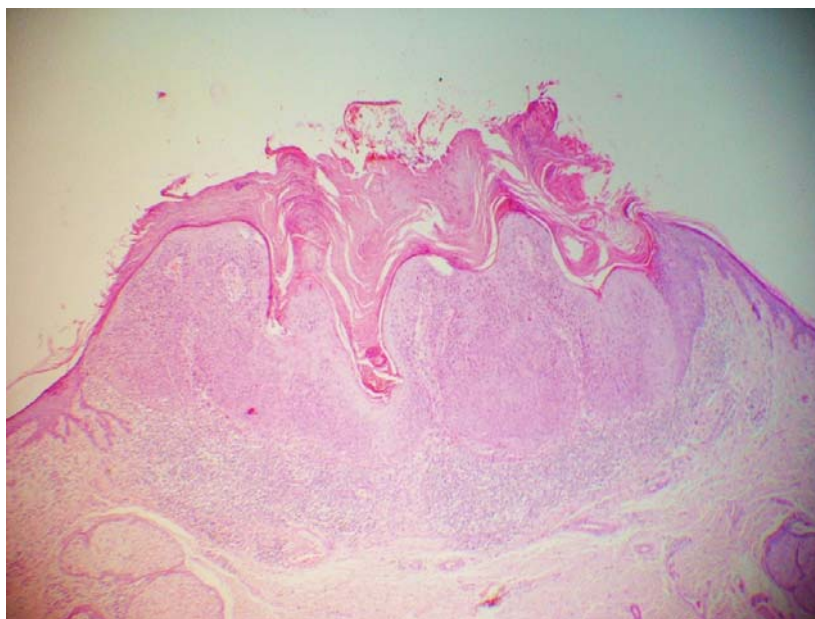
Nova TNM klasifikacija AJCC (American Joint Committee on Cancer) (7.izdanje) iz 2010.god. uključila je neke od čimbenika rizika u cilju poboljšanja stupnjevanja bolesti (33).

### **Histološka obilježja**

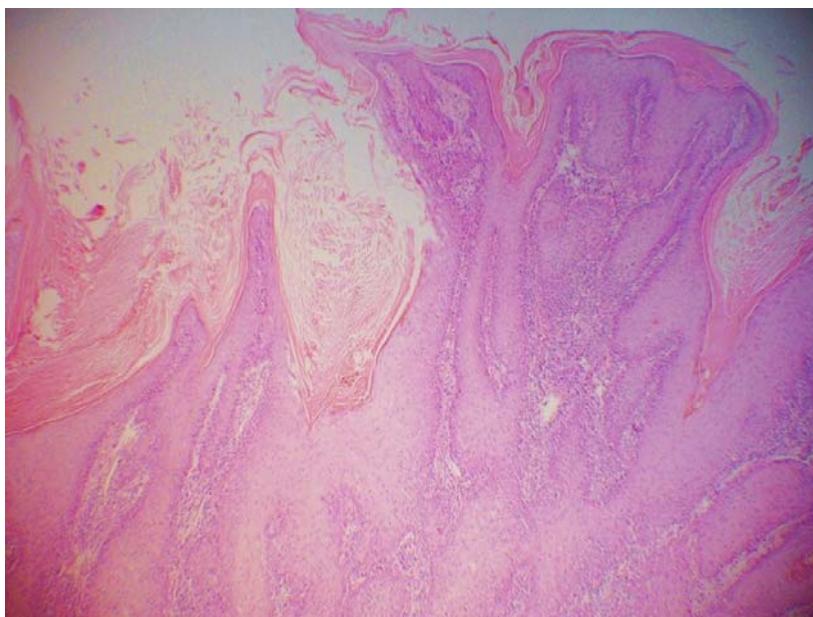
U histološkoj slici planocelularnog karcinoma nalazimo prekomjerno orožnjeni epidermis, atipiju epidermalnih stanica (keratinocita). Dermis je prožet tračcima atipičnih keratinocita unutar kojih se vide područja orožnjenja (perle), a u vezivnoj stromi nalazi se gusti infiltrat limfocita i plazma stanica (Slike 3-5) (25).



**Slika 3.** Patohistološka slika planocelularnog karcinoma kože (HE x40).



**Slika 4.** Patohistološka slika planocelularnog karcinoma kože (HE x40).



**Slika 5.** Patohistološka slika planocelularnog karcinoma kože (HE x40).

Slika 3-5: patohistološka slika planocelularnog karcinoma kože:

Na površini isječka kože nalazi se tumorska tvorba resičaste površine građena od umnoženih atipičnih pločastih stanica epidermisa. Među stanicama i na površini tvorbe se nalazi obilna roževina.

(bojanje hemalaun-eozinom, originalno povećanje  $\times 40$ )

Histološki se planocelularni karcinom klasificira prema Broders-u u slijedeća četiri stupnja (3):

1. stupanj - do 25% nediferenciranih stanica
2. stupanj - do 50% nediferenciranih stanica
3. stupanj - do 75% nediferenciranih stanica
4. stupanj - više od 75% nediferenciranih stanica

### **Dermatoskopska obilježja**

Dermatoskopija je korisna dopunska dijagnostička metoda pri kliničkom pregledu. Krvne žile poput ukosnice, linearne, nepravilne krvne žile, targetoidni dlačni folikuli, bijela bezstrukturalna područja, keratinske mase u središtu tumora i ulceracija, karakteristika su invazivnog SCC (34).

### **Liječenje**

Brojne su mogućnosti liječenja planocelularnog karcinoma kože. Kao terapija izbora preporučuje se kirurška ekscizija, kad god je to moguće. Od ostalih metoda liječenja koriste se frakcionirana radioterapija (do ukupne doze od 50-80 Gy), posebice u bolesnika starije životne dobi, te kod nekih lokalizacija (npr. uška, nos); zatim krioterapija, kiretaža, elektrodisekcija, mikroskopski kontrolirana kirurgija (25,26,35).



### 1.3 RECEPTORI TIROZIN KINAZE

HER signalni putevi igraju važnu ulogu u patofiziologiji nastanka karcinoma. Deregulacija HER-posredovanih signalnih puteva dovodi do rasta i rasapa tumorskih stanica (11).

Obitelj HER receptora obuhvaća četiri strukturno povezana receptora: HER1, HER2, HER3 i HER4 (9,11). Aktivacija obitelji HER receptora nastaje ligand-induciranom dimerizacijom ili sparivanjem receptora (36). Ključni korak u HER-posredovanom signalnom putu je dimerizacija. HER receptori se mogu homodimerizirati (vezati za istovjetnu molekulu) ili heterodimerizirati s drugim članovima HER obitelji (11, 37). Nastanak dimera dovodi do aktivacije intrinzičke domene tirozin kinaze i posljedične fosforilacije specifičnih tirozinskih ostataka, koji služe kao vezna mjesta za mnoge molekule. Nakupljanje ovih molekula dovodi do aktivacije različitih nizvodnih signalnih kaskada, uključujući proliferaciju MAPK signalnog puta i/ili PI3/Akt puta (11, 37-40).

Kao rezultat pretjerane izraženosti ili deregulacije u aktivaciji receptora može doći do: povećane/nekontrolirane stanične proliferacije, smanjenja apoptoze, povećane mobilnosti stanica raka, te anigiogeneze (10, 41,42).

#### Aktivacija HER receptora

Da bi se izvanstanični signali prenijeli unutar stanice potrebna je aktivacija HER receptora. Ona se odvija u nekoliko slijedećih koraka:

1. HER receptor se veže za pridruženi ligand (9).
2. Nakon vezanja liganda, konformacija receptora se mijenja iz zatvorene u otvorenu (9). To se ne odnosi na HER2, koji ne veže ligand i koji je trajno u otvorenoj konformaciji.
3. HER receptor u otvorenoj konformaciji je spreman za dimerizaciju ili sparivanje s drugim HER receptorom (9).  
Dimerizacija je potrebna za aktivaciju nizvodnih signalnih puteva (11). Kako je HER2 u otvorenoj konformaciji, kontinuirano je spreman za dimerizaciju.
4. Nakon dimerizacije receptori su u blizini jedan drugoga i mogu se međusobno aktivirati (16).  
Tijekom transaktivacije, dolazi do fosforilacije tirozin-kinazne domene u receptorima (43).
5. Transaktivacija dovodi do nakupljanja i aktivacije nizvodnih staničnih signalnih proteina, koji imaju brojne učinke na stanicu (43).

#### Regulacija aktivacije HER receptora

Produžena HER aktivacija izaziva štetne učinke na stanicu. Potreban je kompleksni sustav regulacije kako bi se signalni put ugasio kada nije potreban. Ključna komponenta ovog procesa je internalizacija receptora (9).

Kada nastanu ligand-receptor spojevi, mogu se nakupiti na površini stanice (9). Ove nakupine bivaju uvučene u endosome, koji odstranjuju sadržaj iz ostatka stanice (9).

U endosomima se događa jedan od dva procesa:

- Ligand se može otpojiti od HER receptora, koji se onda reciklira natrag na površinu stanice.
- Receptor može biti uništen, te je onemogućen daljnji prijenos signala (9)

### **Učinci HER puta u zloćudnom tumoru**

HER signalni put ima učinak u nastanku mnogih vrsta tumora. Disfunkcija ovog puta je povezana s brojnim solidnim tumorima.

U normalnim, zdravim stanicama aktivacija je strogo regulirana, i na taj način je i stanični rast pod kontrolom (9). U tumoru može doći do neadekvatne aktivacije HER receptora, a posljedica toga je nekontrolirani rast i rasap tumorskih stanica (10).

Pojačana izraženost HER receptora ili prisutnost prevelikog broja receptora na površini stanice, može dovesti do pojačane signalizacije (10). Genetske mutacije mogu dovesti do nastanka HER receptora koji se mogu aktivirati i bez vezanja liganda (10).

Poremećaj u regulaciji HER signalnog puta uključen je u razvoj mnogih vrsta tumora kao što su karcinom dojke, karcinom pluća ne-malih stanica, karcinom jajnika, mokraćnog mjehura, kolorektalni karcinom, karcinom endometrija, jednjaka, želuca, maligni gliom, karcinome glave i vrata, karcinom bubrega, pankreasa, karcinom prostate (10, 12-15).

#### **1.3.1. EGFR (HER1)**

EGFR (*epidermal growth factor receptor*, HER1) je protein koji se nalazi na staničnoj membrani te sudjeluje u procesu rasta stanica u određenim uvjetima. Povećana ekspresija receptora može pridonijeti bržem rastu i širenju tumora, ali i slabijim rezultatima liječenja. Kod bolesnika s nemikrocelularnim karcinomom pluća, EGFR mutacije češće su prisutne u bolesnika s adenokarcinomom, u nepušača, Azijaca i žena (23).

EGFR je tirozin-kinaza koja ima ekstracelularno smještenu domenu na koju se veže ligand, transmembransku regiju i prijenosni modul koji se sastoji od tirozin kinazne osnovice i nekoliko mjesta za autofosforilaciju. Vezanje liganda na receptor dovodi do konformacijske promjene koja omogućuje homodimerizaciju (vezanje) s drugom molekulom EGFR ili drugim članom (heterodimerizacija) HER-obitelji (osobito HER2) i inducira samo-aktivaciju.

Nakon fosforilacije, ovi tirozini služe kao spojna mjesta za spajanje nekoliko molekula koje su povezane s multiplim putevima prijenosa signala.

Signalni putevi koji se uključuju aktivacijom EGFR su slijedeći: RAS-RAF-MEK-MAPK, PLC-gama/PIKC, PI-3K/AKT i mogu aktivirati STAT ili Nfκappa B. Svi ovi signalni putevi često su promijenjeni u tumorima osobito SCC (5).

Aktivacija EGFR u keratinocitima dovodi do: stanične proliferacije i povećanja debljine epidermisa i broja stanica, inducira ili blokira diferencijaciju keratinocita ovisno o eksperimentalnim uvjetima, dovodi do migracije normalnih keratinocita, povećava preživljenje stanica i rezistenciju na apoptozu (5, 44,45).



Povećana izraženost EGFR u tumorima dovodi do stanične proliferacije, preživljenja tumorskih stanica, invazije, angiogeneze i pojave metastaza. U planocelularnom karcinomu pojačana izraženost EGFR izgleda dovodi do pojave agresivnijeg fenotipa tumora(5).

Do sada je utvrđeno da EGFR uzrokuje ili sudjeluje u nastanku tumora gastrointestinalnog, urinarnog i reproduktivnog trakta, tumora mozga, planocelularnih karcinoma i melanoma (46-50).

### 1.3.2. HER2

HER2 (HER2/neu, erbB/2, EGFR2) protein sudjeluje u signalnom putu za rast stanice. HER2 pozitivni karcinomi imaju tendenciju bržeg rasta i diseminacije bolesti. Danas se svaki novodijagnosticirani karcinom dojke i želuca testira imunohistokemijski na izraženost HER2 proteina. U bolesnika s pozitivnim nalazom primjenjuje se specifična terapija monoklonskim protutijelom (trastuzumab) koje se veže na receptor i na taj način inhibira njegovu funkciju (23).

Pojačana izraženost HER2 se pojavljuje u karcinomu dojke i jajnika i izgleda da je povezana sa smanjenim preživljenjem (lošijim ishodom bolesti). Jednake količine HER2 mRNA su pronađene u dobroćudnim nevusima i melanomima, a još i veća izraženost je pronađena u normalnom epidermisu, što govori u prilog funkcije HER2 u proliferaciji i diferencijaciji normalnih stanica epidermisa (50-54).

### 1.3.3.HER3

HER3 protein je otkriven u koži. Pronađen je i u 13%-29% karcinoma dojke. Pojačana izraženost HER3 je zabilježena u tumorima pankreasa, gastrointestinalnog trakta, pluća, mokraćnog mjehura, cerviksa i karcinoma prostate. Međutim PCR (*polymerase chain reaction*, reakcija lančanom polimerazom) analizom 59 uzoraka planocelularnog karcinoma glave i vrata nije zamijećena amplifikacija ni HER2 niti HER3 (46, 50, 53-58) .

### 1.3.4. HER4

HER4 do sada nije dokazan u ljudskoj koži bilo da se radi o zdravoj koži ili o tumorima kože (47).

EGFR, HER2, HER3 i HER4 članovi su obitelji transmembranskih receptora tirozin kinaze (ErbB1-4) i odgovorni su za prijenos ekstracelularnih signala u jezgru. Igraju ključnu ulogu u evoluciji tumora, uključujući rast, diferencijaciju, inhibiciju apoptoze i razvoj metastaza. Uključeni su u patogenezu mnogih malignih tumora u ljudi. U ekstrakutanim, planocelularnim karcinomima postoje dokazi koji govore u prilog da je izraženost RTK jaki, neovisni prognostički pokazatelj lošeg ishoda zloćudne bolesti (47,59,60).

### 1.3.5. Dosadašnja istraživanja RTK u karcinomima kože

**Lavrijsen i suradnici** su u svome radu dokazali prisutnost EGFR u svim stanicama BCC i SCC (61).

**Krahn i suradnici** su ispitivali ulogu RTK u 56 uzoraka normalne kože, u bazocelularnom (BCC) i planocelularnom (SCC) karcinomu. Koristili su konvencionalnu, kvantitativnu i diferencijalnu polimeraza lančanu reakciju (*polymerase chain reaction*, PCR) reverznom transkriptazom (rt)

EGFR i HER3 su bili dominantno izraženi u BCC i SCC, dok je HER2 bio široko rasprostranjen. HER4 nije bio izražen niti u jednom od uzoraka. Zaključili su da bi istodobna izraženost mogla biti odlučujuća za poticanje i održavanje malignog fenotipa. Navedeni rezultati potvrđuju koncept da je izolirana izraženost HER2 kao i EGFR/HER2 većinom prisutna u normalnoj koži, dok je izraženost HER2/HER3 kao i izraženost EGFR/HER2/HER3 češće prisutna u BCC i SCC nego u normalnoj koži. Stoga su autori zaključili da se aktivacija HER3, uz EGFR i HER2 može povezati s malignim fenotipom (47).

**Rittie i suradnici** proučavali su EGFR/ErbB1 signal u humanim BCC i SCC karcinomima kože *in vivo*. Koristili su imunoenzimatski postupak, lasersku mikrodisekciju, uz reakciju reverznom lančanom transkriptazom u realnom vremenu i imunohistokemijsku metodu kako bi procijenili aktivacijsku razinu ErbB1 gena te izraženost proteina, liganada i moguće čimbenike u BCC, SCC, stromi i priležećem epidermisu. Iako su ukupni ErbB1 i mRNA bili slični u tumorskoj i normalnoj koži, pronašli su da je ErbB1 aktivacija jača u SCC u odnosu na BCC ili normalnu kožu. Izraženost navedenih liganada je bila povećana u asimptomatskom epidermisu sa SCC i BCC, u odnosu na normalnu kožu. Ovi rezultati upućuju na to da je EGFR biljeg hiperaktivnosti u tumorskim stanicama SCC ali ne i BCC i okolnom asimptomatskom epidermisu u oba tipa tumora. Ti rezultati upućuju na to da bi ciljano djelovanje na EGFR moglo biti od koristi u liječenju SCC (62).

**Schlauder i suradnici** su pokazali da EGFR i HER2 nisu pojačano izraženi u SCC (63).

**Wimmer i suradnici:** su proučavali izraženost HER3 u tumorima kože i usporedili s normalnom kožom. Upotrijebili su metodu imunohistokemije i RT-PCR (*real time* PCR, PCR u realnom vremenu). Izraženost HER3 je pronađena u 63 % (10/16) BCC, 4/5 SCC i u jednom karcinomu Merkelovih stanica. U skupini malignih melanoma HER3 ekspresija je utvrđena u 35% nodularnih malignih melanoma (6/17), 9/19 površinsko širećih melanoma, uključujući i 2 lentigo maligna melanoma. Većina melanoma veće debljine tumora, kao i 85% metastaza melanoma bile su HER3 pozitivne. Pozitivitet na HER3 utvrđen je u 15/22 nevusa te u 27% uzoraka normalne kože.

Autori su povezali HER3 izraženost s hiperproliferativnim stadijem tumora i smatraju da HER3 ekspresija ukazuje na povećani maligni potencijal kožnih lezija (50).

U zdravom tkivu HER2 i HER3 su zajedno pojačano izraženi, istodobno s početkom epidermalne diferencijacije (50).

**Yamamoto i suradnici** su tehnikom Southern blot-hibridizacije DNA izolirane iz ljudskih tumora dokazali amplifikaciju gena za EGFR u 10 od 12 planocelularnih karcinoma i niti u jednom od 18 staničnih linija drugih tumora (64).

Nadalje, nekoliko autora je proučavalo učinak UV zračenja na aktivaciju RTK, osobito HER2:

**Madson i suradnici** su dokazali da UV-inducirana aktivacija HER2/ErbB2 regulira odgovor kože na UV zračenje. Inhibicija HER2 prije izlaganja UV zračenju suprimira proliferaciju i preživljenje stanica, kao i upalu nakon ekspozicije UV svjetlu. Uz to HER2 je potreban za UV-induciranu ekspresiju brojnih proinflamatornih gena i brojnih citokina. Ovi rezultati su otkrili učinak HER2 u odgovoru kože na UV zračenje i govore u prilog uloge HER2 u UV-induciranim oštećenjima kože, poput karcinoma kože (65,66).

**Xu i suradnici** su pokazali da u *in vitro* uvjetima UV zračenje potiče nakupljanje EGFR u jezgri keratinocita što može dovesti do direktne regulacije ekspresije gena uključenih u proliferaciju keratinocita. Navedeni proces ovisi o fosforilaciji specifičnih EGFR tirozinskih ostataka, a autori smatraju da zajedno s konvencionalnim signalnim putevima posreduje u UV zračenjem potaknutim odgovorima u ljudskim keratinocitima (67).

### 1.3.6. Aktualna primjena anti-HER terapije danas:

Antitijela za EGFR, erlotinib (Tarceva), cetuximab (Erbitux) i gefitinib (Iressa) se već koriste kao monoklonska terapija u liječenju mnogih malignih tumora koji izražavaju EGFR. K tome, trastuzumab (Herceptin), koji je usmjeren na HER2 receptor, također se koristi u liječenju malignih tumora koji izražavaju taj protein. Ovi relativno novi lijekovi, imaju manje nuspojava od konvencionalnih kemoterapeutika, iako ni oni nisu bez rizika. Stoga je od velike važnosti u potpunosti razumjeti potencijalno varijabilne izraženosti ovih receptora između različitih podvrsta kožnih tumora (62,63).

## 1.4. PROTEIN p53

Protein p53 je nazvan “čuvarom genoma”. “Divlji” p53 sprječava duplikaciju mutirane i oštećene DNK, štiti integritet DNK od djelovanja citotoksičnih agenasa (kemikalije, UV i gama-zračenje). Uz pomoć p53 stanica se nakon nepovratnog i jakog oštećenja može ukloniti apoptozom. Jedan je od najčešće mutiranih gena u zloćudnim tumorima (leukemije, limfomi, sarkomi, tumor mozga, karcinom dojke, debelog crijeva i pluća).

Inaktivacija p53 dovodi do destabilizacije genoma u cjelosti. Inaktivira se “točkastom” mutacijom. Mutacije gena za p53 prisutne su u više od 50% svih bazocelularnih i planocelularnih karcinoma kože. Mutirani p53 gen nije funkcionalan, te je izgubljena njegova zaštitna funkcija uvođenja oštećene stanice u apoptozu što pridonosi preživljavanju abnormalnih stanica. Imunohistokemijska analiza izraženosti p53 smatra se korisnim pokazateljem njegovih mutacija.

Za planocelularni karcinom je utvrđena mutacija p53 u >90% slučajeva (19-22).

Za apoptozu keratinocita kod kojih je došlo do UV-induciranog oštećenja DNA („*sunburn cells*”) potreban je p53 tumor supresor koji predstavlja ključni zaštitni mehanizam od karcinoma kože, jer uklanja pre-maligne stanice kod kojih je došlo do nastanka mutacija.

UV zračenje dovodi do povišenja razine p53 čime se zaustavlja stanični ciklus dok se ne popravi oštećenje DNA ili stanica eliminira putem apoptoze.

Oštećenje funkcije p53 dovodi do slabljenja ovog obrambenog mehanizma koji se zasniva na apoptozi, čime se UV-oštećenim stanicama omogućava preživljavanje dodatnih ciklusa UV ekspozicije (3).

Daljnje oštećenje p53 i drugih gena dodatnim mutacijama induciranim UV zračenjem, vodi do jače rezistencije na apoptozu, povećane proliferacije stanica, te konačno do razvoja planocelularnog karcinoma (3).

Danas postoje dokazi da UV zračenje ne samo da dovodi do novih mutacija već i do eksponencijalnog rasta brojnih p53 mutiranih klonova koji se mogu pronaći u epidermisu koji je kronično izložen UV zračenju (68).

Uz mutaciju, p53 može biti ugrožen i u keratinocitima inficiranim HPV-om.

Protein E6 koji je kodiran onkogenim tipovima HPV-a veže p53 i dovodi do njegove brze degradacije, što onemogućava p53-posredovanu apoptozu.

To je primarni mehanizam kojim HPV infekcija dovodi do nastanka planocelularnog karcinoma (69).

Neki HPV- tipovi mogu dodatno vezati UV-inducirani p53 i dovesti do pojačane ekspresije virusnih gena (70).

P53 surađuje s obitelji inhibicije rasta (*inhibitor of growth, ING family*) u supresiji inicijacije i progresije karcinoma (71).

Studije su pokazale povezanost imunohistokemijskog stupnja izraženosti mutiranog p53 s navikama oboljelih osoba, histološkim stupnjem te kliničkim stadijem planocelularnog karcinoma (72).

Poznato je da postoji obitelj p53 koja uz p53 obuhvaća p63 i p73 za koje je također dokazana važnost u nastanku različitih karcinoma, osobito planocelularnog (73,74).

## 1.5. Ki67

Ki67 proliferacijski indeks mjeri količinu jezgrinog antigena Ki67 koji je smješten na dugom kraku kromosoma 10. Ekspresija tog gena u razmjeru je s drugim biljezima proliferacije kao što su udio stanica u S- fazi. Visoki Ki67 indeks znak je loše prognoze, a povezan s mogućim dobrim odgovorom na kemoterapiju. Razina Ki67 niska je u G1 i ranoj S fazi i progresivno raste do svojeg maksimuma u mitozu.

Proliferacijski indeks Ki67 grupira se u tri skupine: nizak – ekspresija do 15%, intermedijarni – izraženost 15%-30%, te visoki - izraženost viša od 30%. Prognostička vrijednost Ki67 dokazana je u tumorima prostate, mozga i dojke. Visoki Ki67 korelira s drugim biomarkerima, lošijom prognozom te ranijim recidivima (23).

Monoklono Ki67 antitijelo u imunohistokemijskoj reakciji reagira s antigenom jezgre koji je prisutan u svim stanicama u proliferaciji, koje su u aktivnom dijelu staničnog ciklusa, kao što je G1, S, G2 i mitozu, ali nije prisutan u stanicama koje se nalaze u G0 fazi. Na taj način se uz pomoć ovog antitijela može odrediti postotak tumorskih stanica u fazi proliferacije.

Jedan od tumora u kojemu se najdalje otišlo u istraživanju biologije i biomarkera je svakako karcinom dojke. Standardni patološki nalaz danas uključuje i nalaz najvažnijih biomarkera koji uz estrogenske (ER), progesteronske (PR), HER receptore, uključuje i Ki67. Iako se o prognostičkoj ulozi Ki67 u ovome karcinomu i dalje raspravlja većina provedenih studija dokazala je povezanost Ki67 i ukupnog preživljenja (*overall survival*, OS), kao i preživljenja bez bolesti (*disease free survival*, DFS) (75-78).

Novija istraživanja otkrivaju membransku i citoplazmatsku aktivnost Ki67, tako **Faratian i suradnici** povezuju membransku i citoplazmatsku imunoreaktivnost Ki67 s HER2 imunoreaktivnošću, negativnim estrogenim receptorima (ER) i invazivnim karcinomima dojke. Za sada se ova reaktivnost ne povezuje s proliferacijom (24,79) .



Očekuje se veća izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze, biljega proliferacije Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu, također se, s obzirom da je UV zračenje jedan od aktivatora transmembranskih receptora tirozin kinaze, očekuje veća izraženost RTK u osoba s multiplim planocelularnim karcinomima, svjetlijeg fototipa prema Fitzpatrick-u koje su prema anamnestičkim podacima bile izložene pojačanom UV zračenju, te zadobile opekline u djetinjstvu.





**Primarni cilj:**

**Usporediti** izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega proliferacije Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.

**Sekundarni ciljevi:**

1. **Odrediti** izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), nuklearnu/membransku/citoplazmatsku izraženost biljega Ki67, te izraženost proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože te u zdravoj koži.
2. **Usporediti** izraženost navedenih biljega u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu, te između multiplog i solitarnog planocelularnog karcinoma.
3. **Utvrditi** postoji li povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s nuklearnom, membranskom i citoplazmatskom Ki67 imunoreaktivnošću te izraženošću proteina p53 u solitarnom, multiplom planocelularnom karcinomu, kao i u zdravoj koži.
4. **Utvrditi** postoji li povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s pojavom multiplih tumora kože, fototipom kože, te anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju i broju sunčevih opeklinu u djetinjstvu, te pokušati izdvojiti skupinu bolesnika s rizikom nastanka multiplih tumora i kandidate za dodatne terapijske postupke.



## 4.1. MATERIJALI

### 1. Uzorci

- a) Ispitivana skupina je obuhvatila 101 bolesnika kod kojih je utvrđeno 134 planocelularnih karcinoma kože, različitog patohistološkog stupnja određenog prema Brodersovoj klasifikaciji. Unutar skupine bolesnika s planocelularnim karcinomom izdvojene su dvije podskupine. Skupina bolesnika sa solitarnim tumorom obuhvaćala je 65 bolesnika. Skupina bolesnika sa multiplim planocelularnim tumorima obuhvatila je 36 bolesnika koji su ukupno imali 69 tumora.
- b) Kontrolnu skupinu činila su 134 uzorka zdrave kože (histološki normalna peritumorska koža koju od planocelularnog karcinoma odvaja zona normalne kože širine najmanje 4 mm). Radilo se o istim bolesnicima, čiji su uzorci planocelularnih karcinoma obrađeni u ispitivanoj skupini.

Većina uzoraka su s fotoeksponirane kože.

Koristili su se parafinski blokovi planocelularnog karcinoma kože, koji su dobiveni nakon ekscizijske biopsije gore navedenih promjena u Klinici za dermatovenerologiju KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od 1. siječnja, 2007. do 31. prosinca 2009. godine.

Dijagnoza je postavljena temeljem anamneze, kliničke slike, te pregledom hemalaun-eozinom obojenih patohistoloških preparata.

2. Svi ispitanici su ispunili upitnik, koji je sadržavao osnovne epidemiološke, kliničke te podatke o izloženosti UV zračenju tijekom života. Pojačana izloženost UV zračenju definirana je kao izloženost UV zračenju (boravak na moru i sl.) u trajanju duljem od 3 tjedna godišnje. Primjer upitnika nalazi se u prilogima doktoratu.

U istraživanje su uključeni bolesnici stariji od 50 godina, oba spola, s patohistološkom dijagnozom planocelularnog karcinoma, bez prethodne terapije, čiji su uzorci bili dostatni za dodatnu imunohistokemijsku analizu, te oni koji su imali potpune kliničke podatke dobivene upitnikom.

## 4.2. METODE

Materijal dobiven ekscizijskom biopsijom u cjelosti je patohistološki pregledan, a dodatni rezovi tkiva imunohistokemijski su obrađeni.

### 4.2.1. Histološka analiza

Svi uzorci fiksirani su u 10% formaldehidu, uklopljeni u parafin, rezani u rezove debljine 4  $\mu\text{m}$  i obojeni hemalaun-eozinom. Preparate je analizirao patolog, koji je dodatno klasificirao tumore po Brodersovoj klasifikaciji.

### 4.2.2. Imunohistokemijske metode

Za imunohistokemijsko bojanje koristilo se u formalinu fiksirano tkivo uklopljeno u parafinske blokove koje je rezano na rezove tkiva debljine 4  $\mu\text{m}$ .

Svi uzorci obojani su standardnim imunohistokemijskim postupkom komercijalno dostupnim protutijelima na EGFR (klon E30, razrjeđenje 1:25, Dako, Glostrup, Denmark), HER2 (Hercep Test, Dako, Glostrup, Denmark), HER 3 (klon DAK-H3-IC, razrjeđenje 1:100, Dako, Glostrup, Denmark), p53 (klon DO-7, razrjeđenje 1:50, Dako, Glostrup, Denmark), Ki67 (klon MIB-1, razrjeđenje 1:100, Dako, Glostrup, Denmark).

Za deparafinizaciju, rehidraciju i demaskiranje antigena korišten je PT LINK aparat (Dako, Cytomation, 95°C, 15 minuta) za HER2, HER3, Ki-67, p53 uz citratni pufer pH 6,0 za HER2, HER3 te Target retrieval otopinu pH 9,0 za Ki-67 i p53. Za EGFR korišten je pretretman s proteinazom.

Za vizualizaciju izraženosti biljega korišten je streptavidin-biotin set (LSAB, Dako, Glostrup, Denmark) za EGFR, HER2, Ki-67, p53 te CSA II bezbiotinski set (Dako, Glostrup, Denmark) za HER3 u automatskom stroju za bojenje (TechMate, Dako) koji koristi kapilarnu aktivnost. Za svako protutijelo napravljena je kontrolna pozitivna i negativna reakcija.

Pozitivnom reakcijom na protutijela EGFR i HER2 smatrala se membranska obojenost stanica. Pozitivnom reakcijom na HER3 smatrala se citoplazmatska obojenost stanica. Kao pozitivna reakcija na p53 smatrana je obojenost jezgre stanice, dok je kod analize Ki67 pozitivnom reakcijom smatrana obojenost jezgre i/ili citoplazme stanice.

Procjena pozitivnosti tumora na EGFR temeljila se na: 1. postotku pozitivnih stanica; 2. intenzitetu bojenja citoplazme (negativno, slabo, srednje, jako pozitivan).

Pozitivnim su se uzorcima smatrali oni kod kojih više od 30% stanica pokazuje pozitivitet u bilo kojem intenzitetu bojenja.

Za procjenu pozitivnosti HER-2 protutijela koristili smo kriterije za karcinome dojke navedene u tablici 3. Pozitivnost uzorka temeljila se na dva elementa: 1. postotku pozitivnih stanica; 2. intenzitetu bojanja membrane stanica, iz čega je izračunat rezultat (score).

**Tablica 3.** Procjena pozitivnosti za HER-2.

Rezultat	Procjena izraženosti HER2	Intenzitet bojanja
0	Negativna	Nema obojenosti, ili je obojenost membrane prisutna u <30% stanica
1+	Negativna	Obojenost membrane slabog intenziteta vidljiva u >30% tumorskih stanica. Nepotpuna obojenost membrane.
2+	Slabo pozitivna	Slaba do umjerena obojenost membrane u >30% stanica.
3+	Jako pozitivna	Intenzivna obojenost cijele membrane u >30% tumorskih stanica.

Rezultat 3+ smatrali smo pozitivnim, dok bismo rezultat 2+ dodatno testirali CISH (kromogena *in situ* hibridizacija) metodom.

Pozitivnim na HER3 smatrali smo uzorak građen od više od 30% citoplazmatski obojenih stanica u bilo kojem intenzitetu bojanja.

Pozitivnom reakcijom na protutijelo Ki-67 smatrana je nuklearna obojanost stanica. Također je napravljena analiza citoplazmatske obojanosti stanica. Rezultat je izražen u obliku postotka (%) obojenih stanica. Rezultat Ki67  $\geq 30\%$  pozitivnih stanica je smatran pozitivnim.

Pozitivnom reakcijom na protutijelo p53 smatrana je obojenost stanične jezgre i izražena je u obliku postotka tumorskih stanica. Pozitivan rezultat je smatran ukoliko je nađeno >25% obojenih jezgri.

U analizi dobivenih rezultata sudjelovala je uz nadzor patologa doc.dr.sc Ivane Ilić i pristunica, dr. Daniela Ledić Drvar.

### 4.2.3 Statističke metode

Zbog veličine uzorka i osobitosti podataka korištene su neparametrijske statističke metode i statistički prikazi. Kao mjera središnje tendencije numeričkih podataka korišten je medijan, a kao mjera varijabilnosti interkvartilni raspon. U prikazu kategorijskih podataka korišteni su apsolutni brojevi i odgovarajući udjeli. U analizi numeričkih podataka korišten je Mann-Whitney U test za usporedbu razlika između dvije skupine. Za analizu kategorijskih varijabli korišten je hi-kvadrat test. Analiza je provedena korištenjem statističkog paketa R, sa razinom statističke značajnosti postavljenom na  $P < 0,05$ .





### 5.1. Opis ispitivanog uzorka

Opis ispitivanog uzorka prikazan je u tablici 4. Kako se u ispitivanoj i kontrolnoj skupini radilo o istim bolesnicima, raspodjela ispitanika prema osnovnim demografskim karakteristikama odgovarala je raspodjeli dobi kako je navedeno za skupinu bolesnika s planocelularnim karcinomom kože.

**Tablica 4.** Opis ispitivanog uzorka (N=101).

		N	%
Dobne skupine	≤60 godina	10	9,9%
	61-70 godina	22	21,8%
	71-80 godina	44	43,6%
	>80 godina	25	24,8%
Spol	Muški	55	54,5%
	Ženski	46	45,5%
Multipli/soltarni tumor	Multipli	36	35,6%
	Solitarni	65	64,4%
Fototip	Tip 2	54	53,5%
	Tip 3	47	46,5%
UV zračenje tijekom života	Da	93	92,1%
	Ne	8	7,9%
Broj sunčevih opeklin u djetinjstvu	3 i više	40	39,6%
	<3	61	60,4%
Lokalizacija*	Glava i vrat	82	61,2%
	Vlasište	12	9,0%
	Ruka	20	14,9%
	Noga	10	7,5%
	Leđa	5	3,7%
	Trup sprijeda	4	3,0%
	Glutealno	1	0,7%
Stupanj**	1	70	52,2%
	2	56	41,8%
	3	8	6,0%

\* % se odnosi na ukupni broj tumora N=134

\*\* patohistološki stupanj tumora (određen po Brodersu)

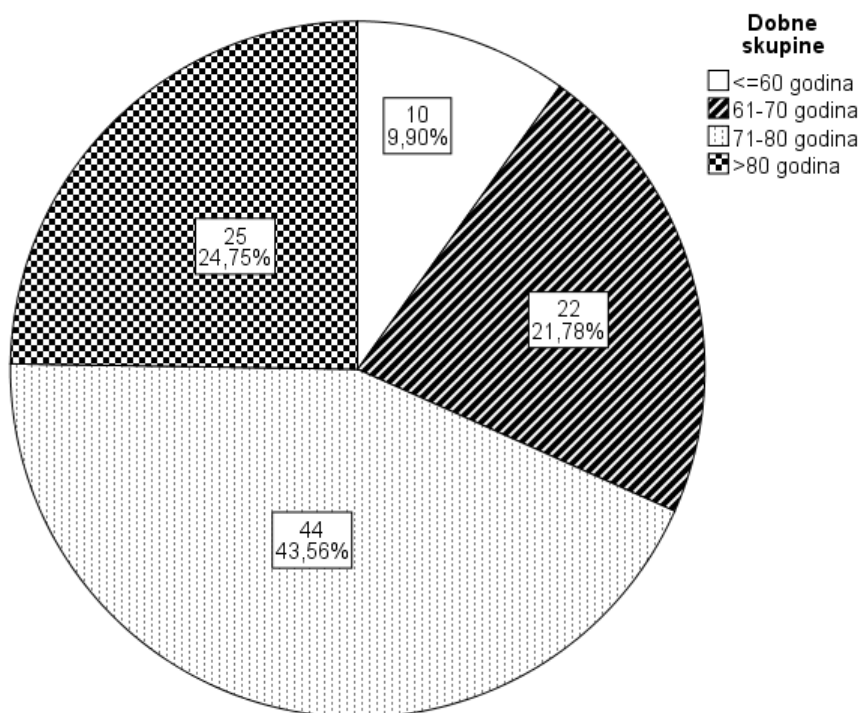
Tablica 4 prikazuje opisnu statistiku ispitivanog uzorka. Slike 6 do 12 prikazuju raspodjelu pojedinih vrijednosti u odnosu na ukupni uzorak.

### 5.1.2. Raspodjela ispitanika prema dobi

U istraživanje je uključen 101 bolesnik, čija se dob kretala između 50 i 97 godina.

Najviše bolesnika (N=44, odnosno 43,56%) bilo je u skupini bolesnika u dobi između 71 i 80 godina.

Raspodjela ispitanika prema dobi prikazana je na slici 6.

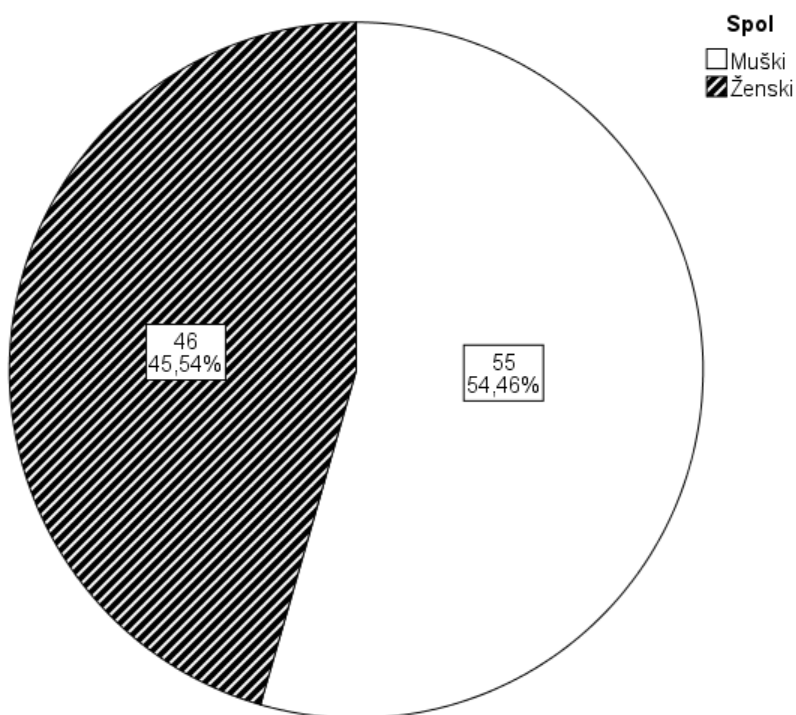


**Slika 6.** Raspodjela ispitivane skupine prema dobi.

### 5.1.3. Raspodjela ispitanika prema spolu

U istraživanje je bilo uključeno 55 (54,46%) muškaraca i 46 (45,54%) žena. Zbog ranije objašnjenog načina odabira kontrolne skupine, isto se odnosi i na kontrolnu skupinu.

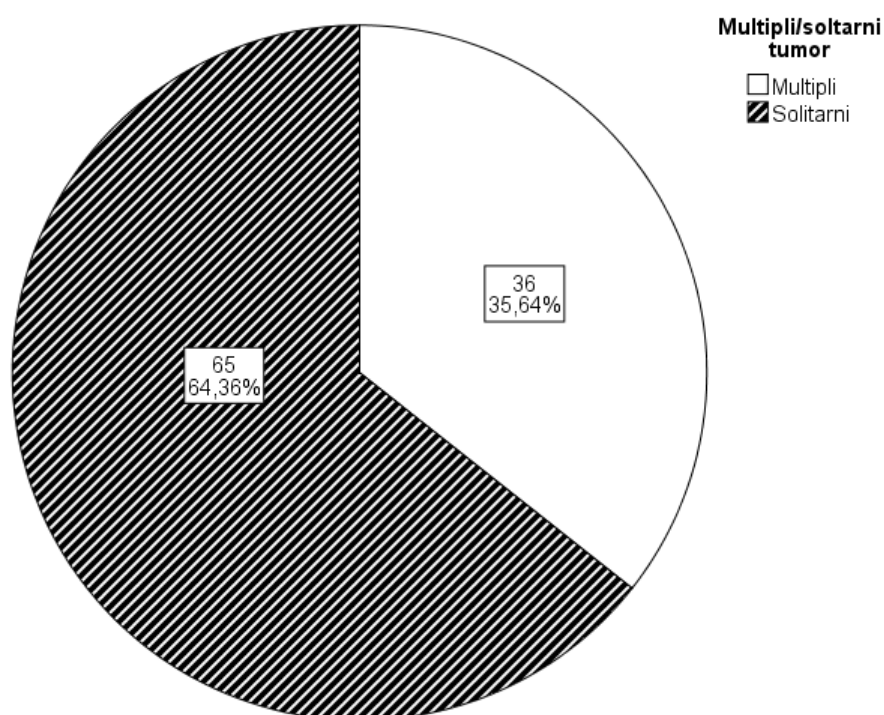
Raspodjela bolesnika prema spolu prikazana je na slici 7.



**Slika 7.** Raspodjela ispitivane skupine prema spolu.

#### 5.1.4. Raspodjela ispitanika prema broju tumora (solitarni/multipli)

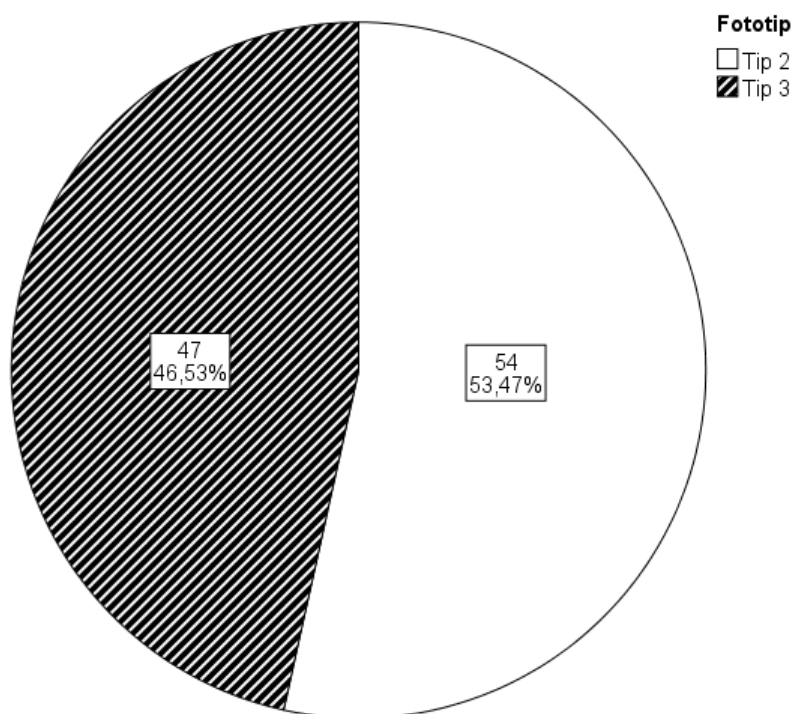
Istraživanjem je obuhvaćeno 36 (35,64%) bolesnika s multiplim i 65 (64,34%) bolesnika sa solitarnim planocelularnim karcinomom. Raspodjela ispitanika prema broju tumora prikazana je na slici 8.



**Slika 8.** Raspodjela ispitivane skupine prema broju tumora.

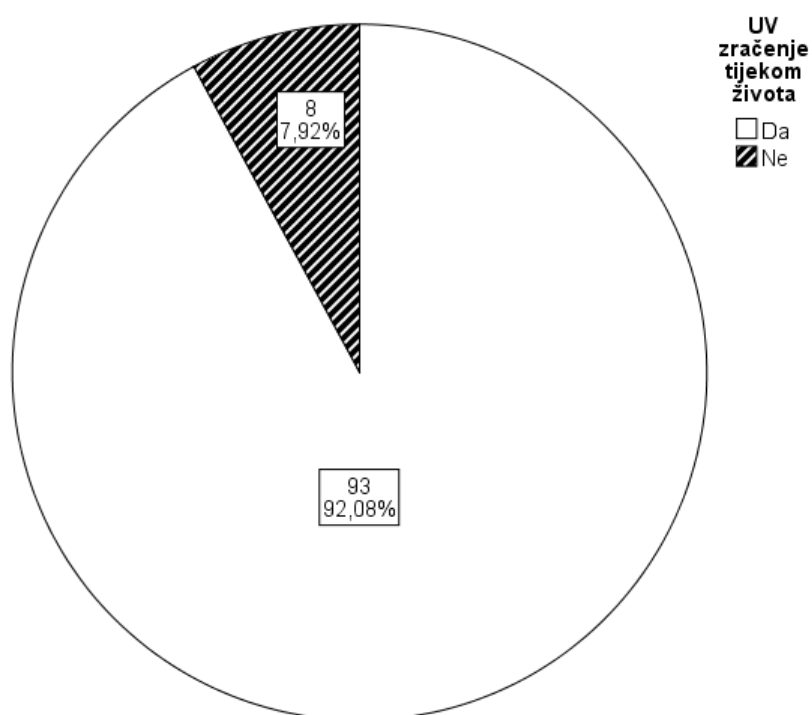
### 5.1.5. Raspodjela ispitanika prema fototipu kože, izloženosti UV zračenju i sunčevim opeklinama u djetinjstvu

U ispitivanoj skupini bili su zastupljeni slijedeći fototipovi kože (prema Fitzpatricku): 54 (53,47%) bolesnika bilo je fototipa II, dok je 47 (46,53%) bolesnika bilo fototipa kože III. Raspodjela ispitanika prema fototipu kože prikazana je na slici 9.



**Slika 9.** Raspodjela ispitivane skupine prema fototipu kože.

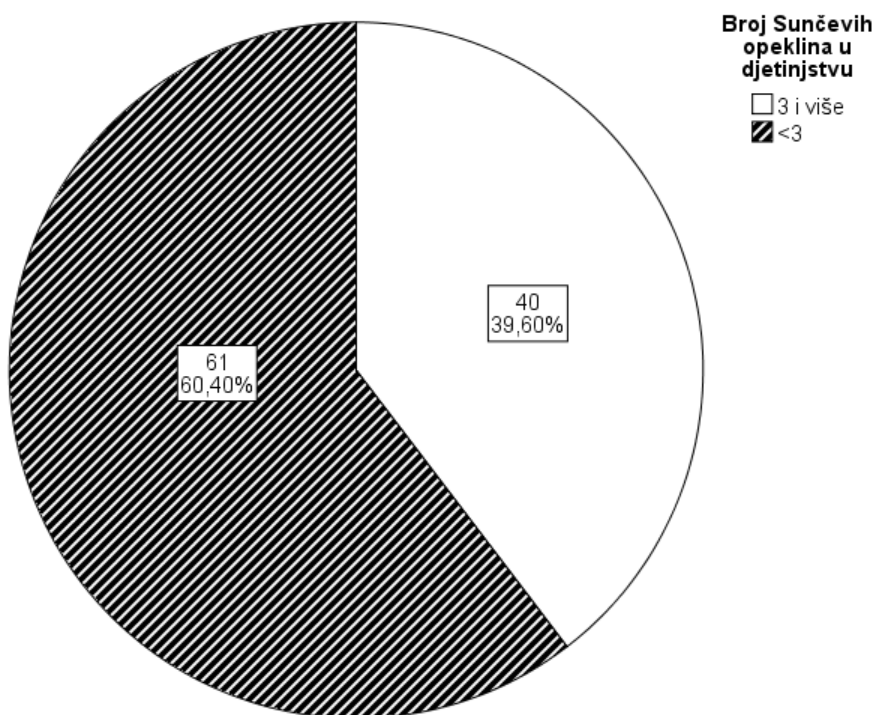
Većina ispitanika (N= 93, 92,08%) je tijekom života bila izložena pojačanom UV zračenju. Raspodjela ispitanika prema izloženosti UV zračenju tijekom života prikazana je na slici 10.



**Slika 10.** Raspodjela ispitivane skupine prema UV zračenju tijekom života.

Tri ili više sunčevih opeklinu u djetinjstvu je imalo 40 (39,60 %).

Raspodjela ispitanika prema zadobivenim sunčevim opeklinama u djetinjstvu prikazana je na slici 11.



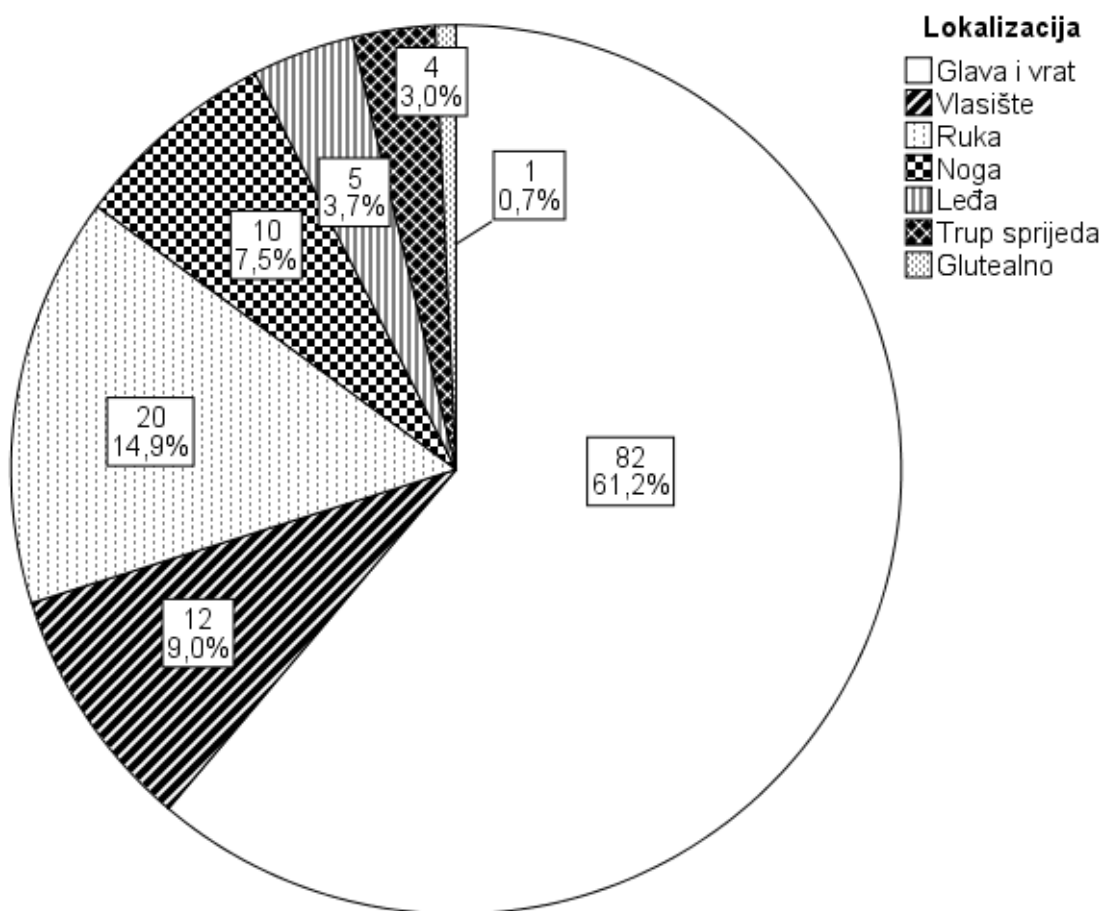
**Slika 11.** Raspodjela ispitivane skupine prema broju sunčevih opeklinu u djetinjstvu.

### 5.1.6. Raspodjela ispitanika prema lokalizaciji tumora

Prilikom odabira uzoraka, u istraživanje su uključeni bolesnici s planocelularnim karcinomom kože u kojih su lezije bile većinom smještene na fotoekspoziranim predjelima tijela, a isto se odnosi i na kontrolnu skupinu.

Većina lezija bila je smještena u predjelu glave i vrata (N=82, 61,19%).

Raspodjela prema lokalizaciji tumora prikazana je na slici 12.



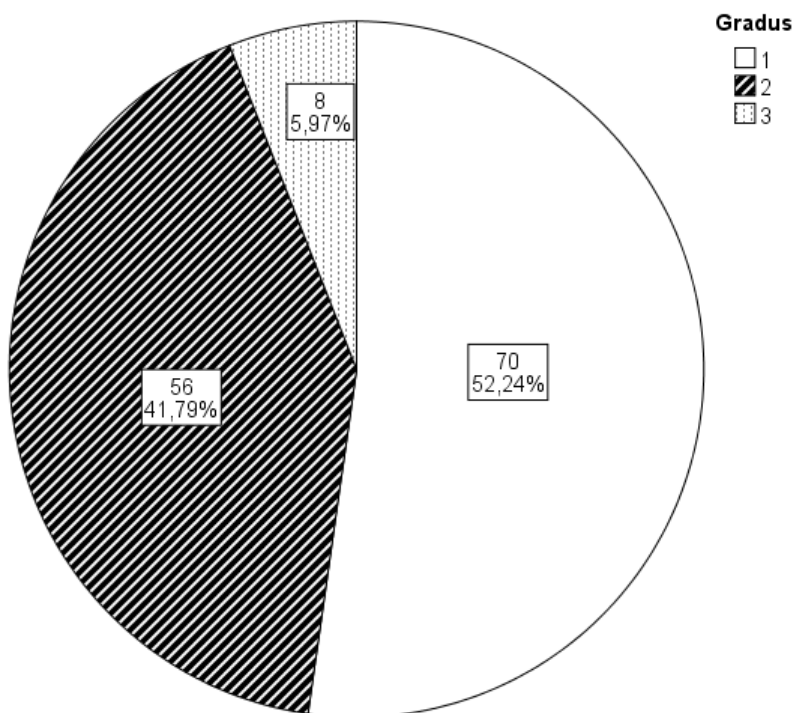
**Slika 12.** Raspodjela ispitivane skupine prema lokalizaciji tumora.



### 5.1.7. Raspodjela uzoraka prema patohistološkom stupnju tumora

Svim uzorcima planocelularnog karcinoma obuhvaćnim istraživanjem određen je patohistološki stupanj (stupnjevanje prema Broders-u. Molim, vidjeti uvod). Više od polovice uzoraka (N=70, 52,24%) bilo je stupnja 1; 56 (41,79%) uzoraka bilo je stupnja 2; dok je 8 (5,97%) uzoraka bilo patohistološkog stupnja 3 prema Broders-u.

Raspodjela uzoraka prema patohistološkom stupnju tumora prikazana je na slici 13.



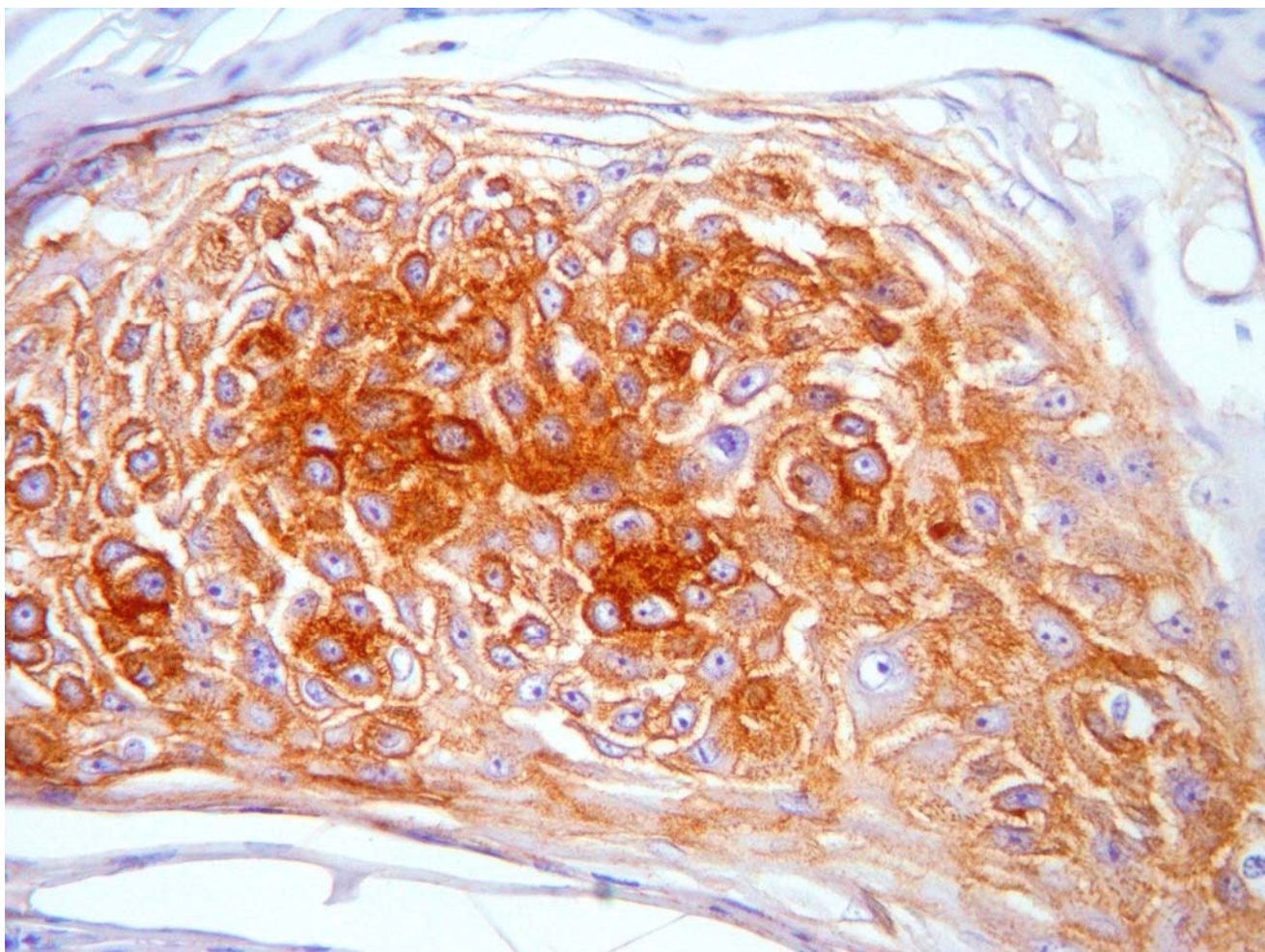
**Slika 13.** Raspodjela uzoraka prema patohistološkom stupnju tumora.

## 5.2. Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu

Imunohistokemijskom analizom dobili smo slijedeće rezultate:

### EGFR

EGFR je bio pozitivan u 82% (N=109) uzoraka planocelularnog karcinoma. Negativan je bio u svim uzorcima zdrave kože (slike 14 i 15).



**Slika 14.** Imunohistokemijska analiza izraženosti EGFR u planocelularnom karcinomu kože.

Opis: tumorske stanice dobro diferenciranog karcinoma pločastih stanica pokazuju citoplazmatsko i membransko bojanje jakog intenziteta na EGFR (imunohistokemijsko bojanje, EGFR, x 400).



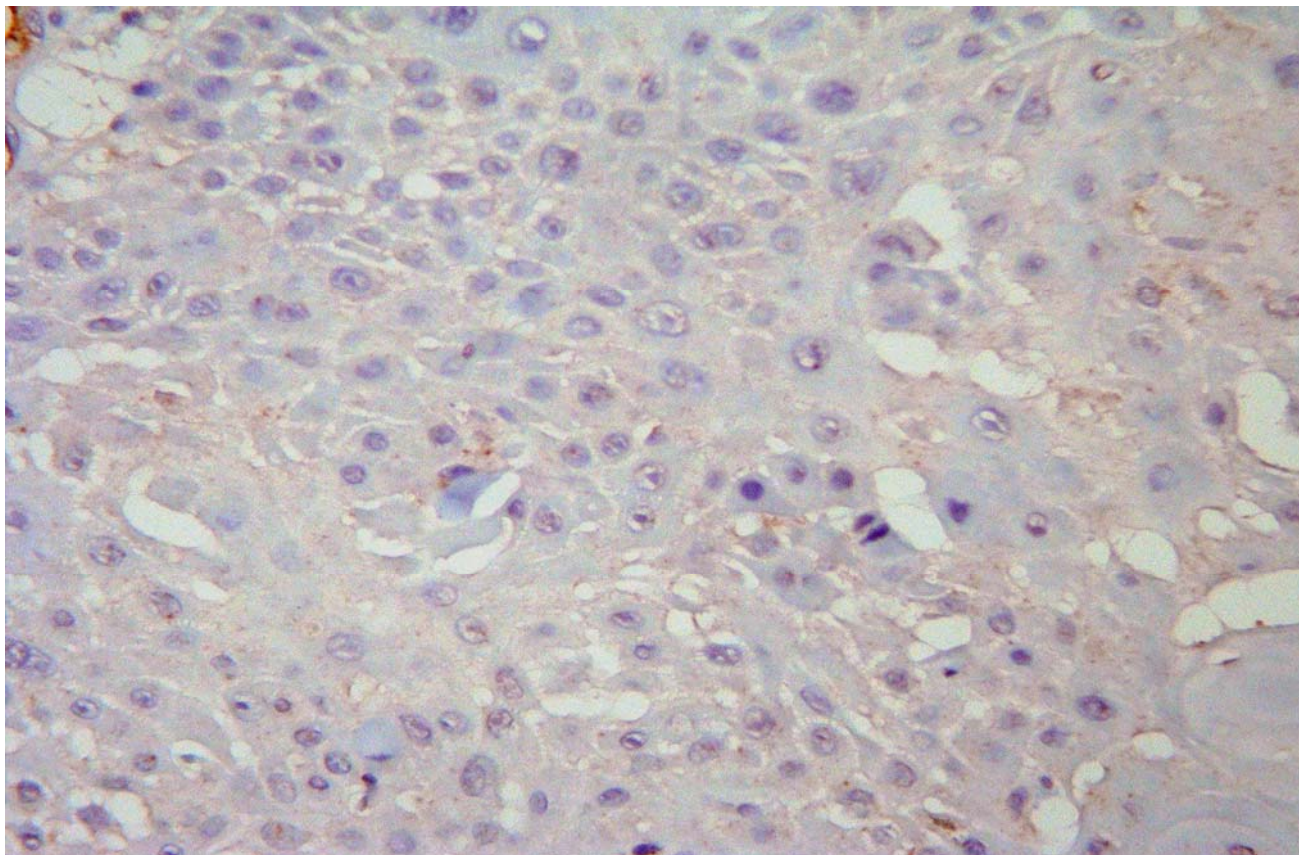
**Slika 15.** Imunohistokemijska analiza izraženosti EGFR u zdravoj koži.

Opis: u normalnom epitelu stanice bazalnog sloja pokazuju membranski pozitivitet jakog intenziteta bojanja na EGFR (imunohistokemijsko bojanje, EGFR, x 100).



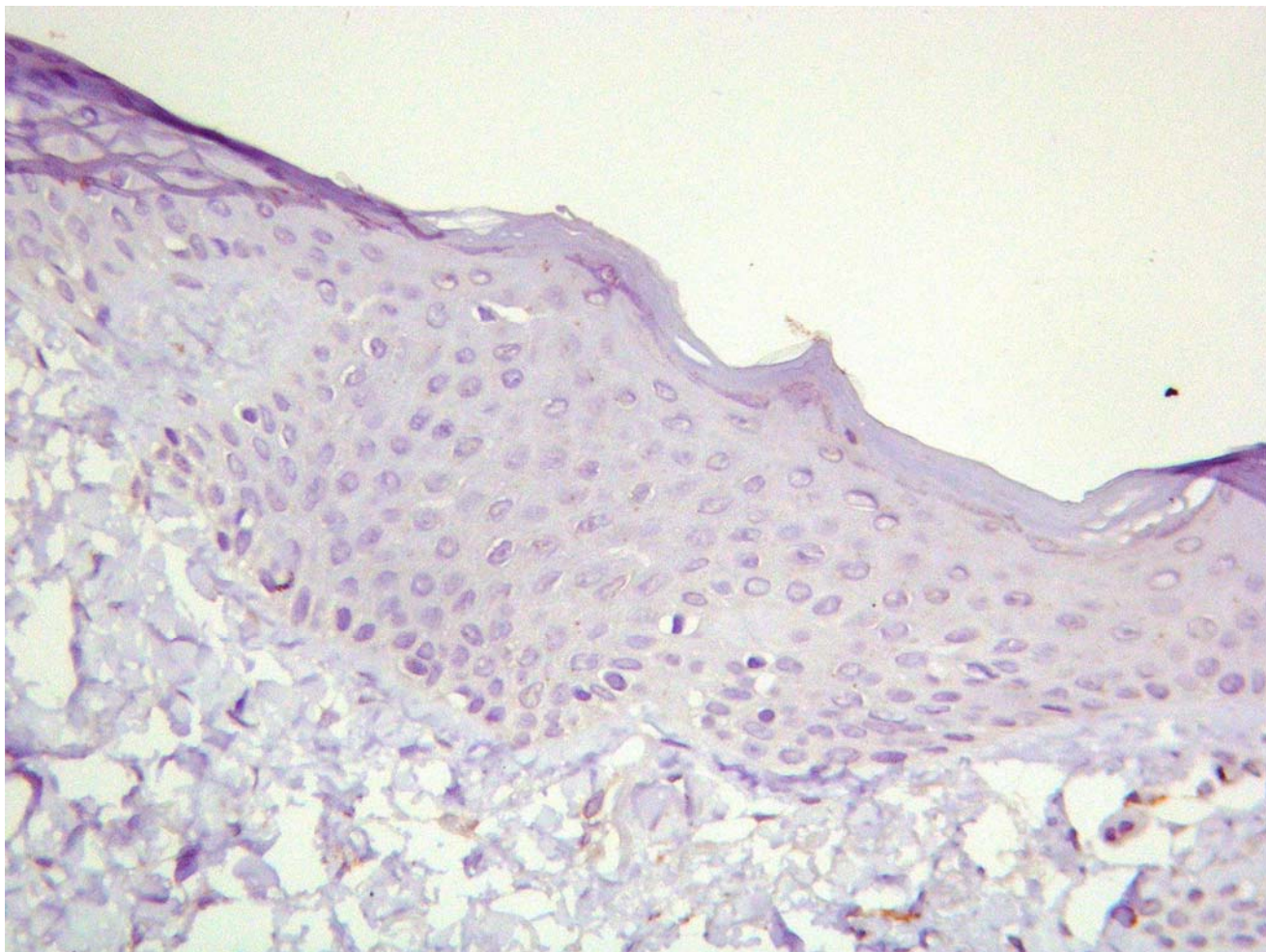
**HER2**

HER2 je bio negativan u svim uzorcima planocelularnog karcinoma i zdrave kože (Slike 16 i 17).



**Slika 16.** Imunohistokemijska analiza izraženosti HER2 u planocelularnom karcinomu kože.

Opis: tumorske stanice su negativne na imunohistokemijsko bojanje na HER2 (imunohistokemijsko bojanje, Hercept test, x 400).



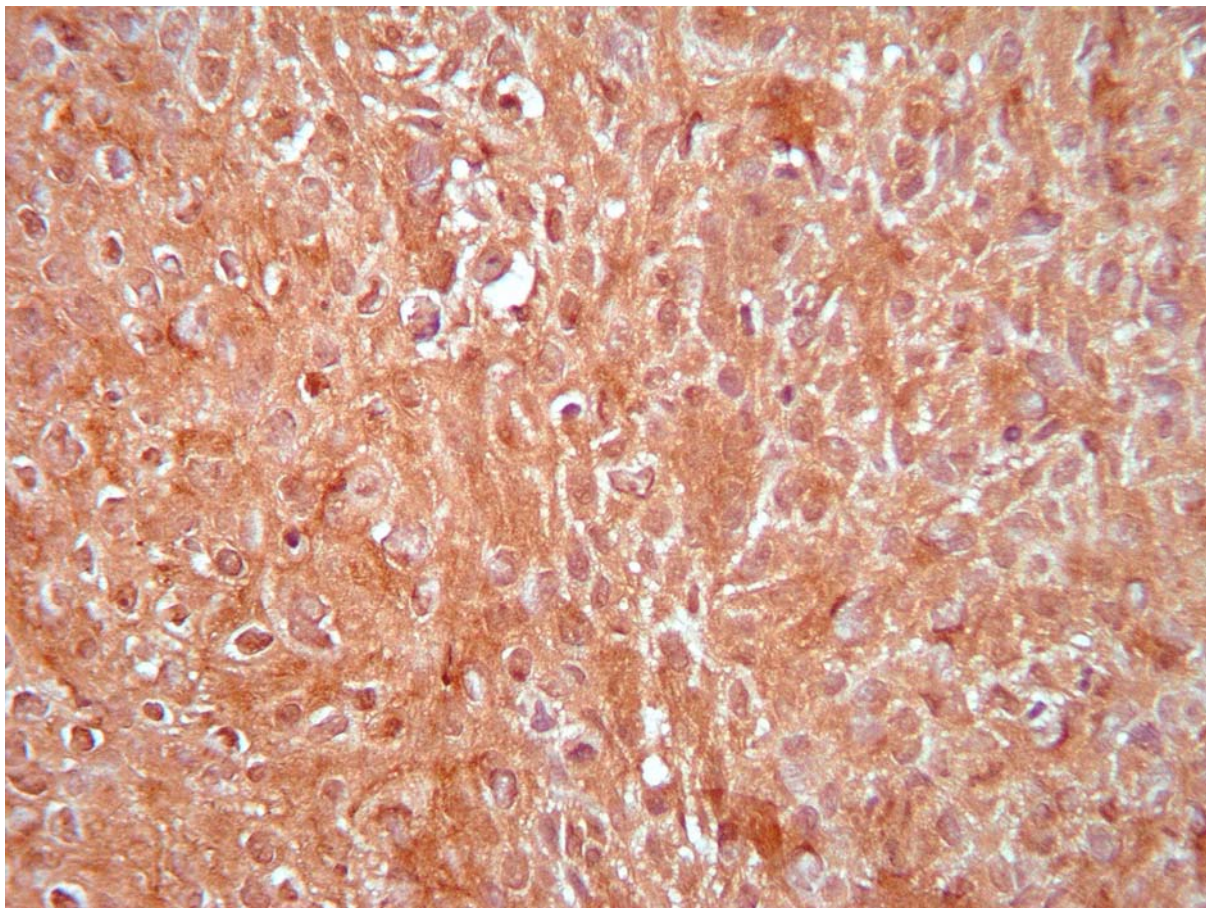
**Slika 17.** Imunohistokemijska analiza izraženosti HER2 u zdravoj koži.

Opis: Stanice normalnog višeslojnog pločastog epitela ne sadrže HER 2 (imunohistokemijsko bojanje, Hercept test, x 100).



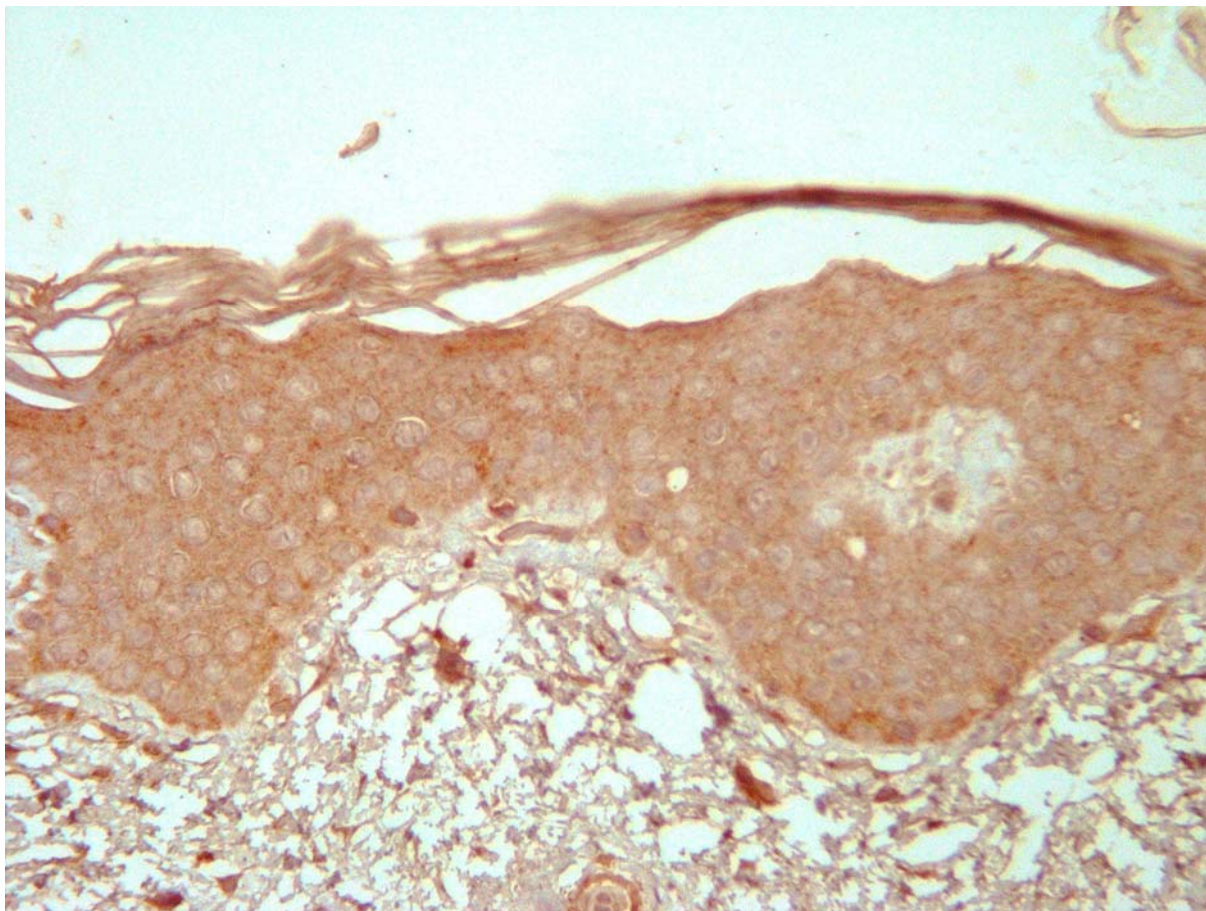
**HER3**

HER3 je bio pozitivan u svim uzorcima planocelularnog karcinoma i zdrave kože (slike 18 i 19).



**Slika 18.** Imunohistokemijska analiza izraženosti HER3 u planocelularnom karcinomu kože.

Opis: sve tumorske stanice umjerno diferenciranog karcinoma pločastih stanica pokazuju citoplazmatski pozitivitet jakog intenziteta na HER3 (imunohistokemijsko bojanje, HER3, x 400).



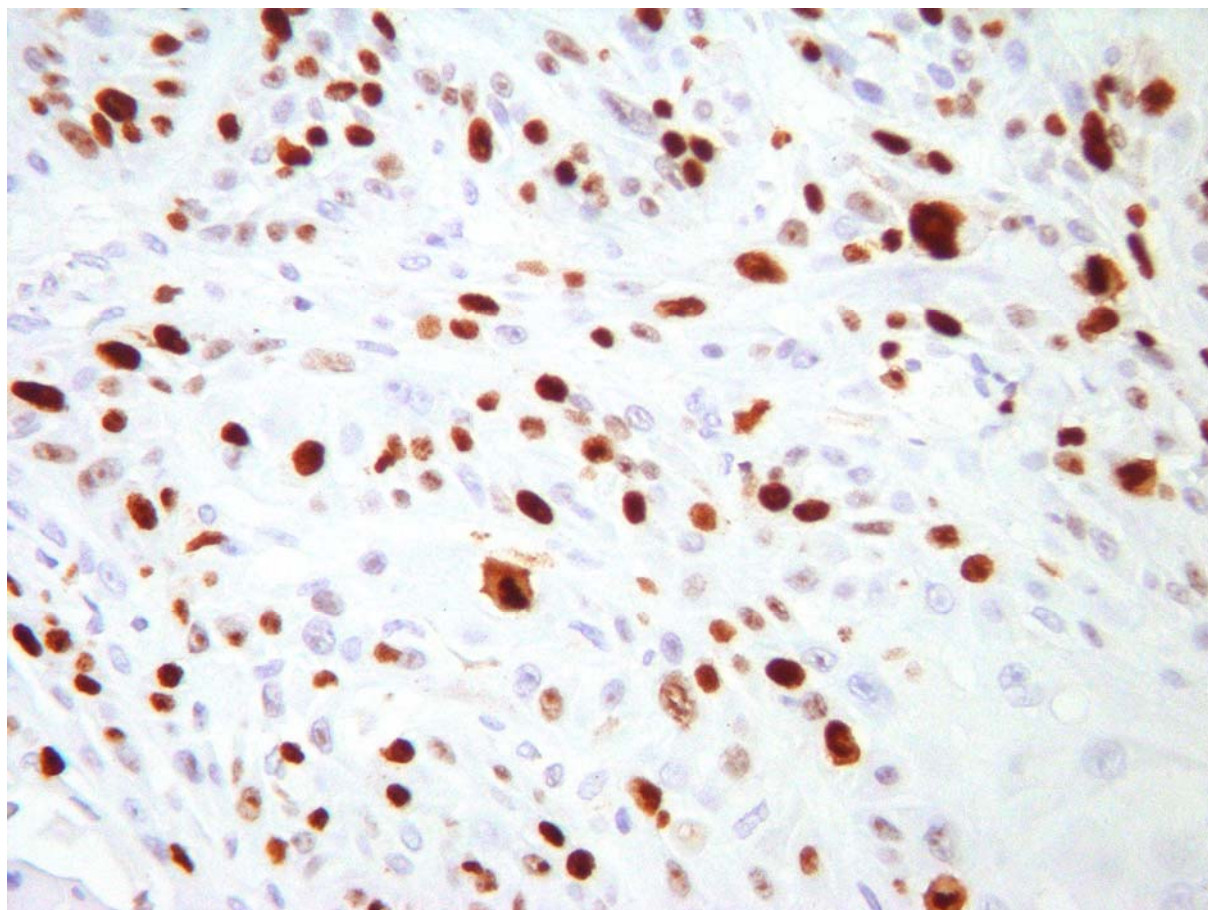
**Slika 19.** Imunohistokemijska analiza izraženosti HER3 u zdravoj koži.

Opis: HER3 se nalazi u citoplazmama stanica svih slojeva normalnog višeslojnog pločastog epitela. Imunohistokemijsko bojenje na HER3 pokazuje obojenost citoplazmi umjerenog do jakog intenziteta (imunohistokemijsko bojanje, HER3, x100).



### **Ki67**

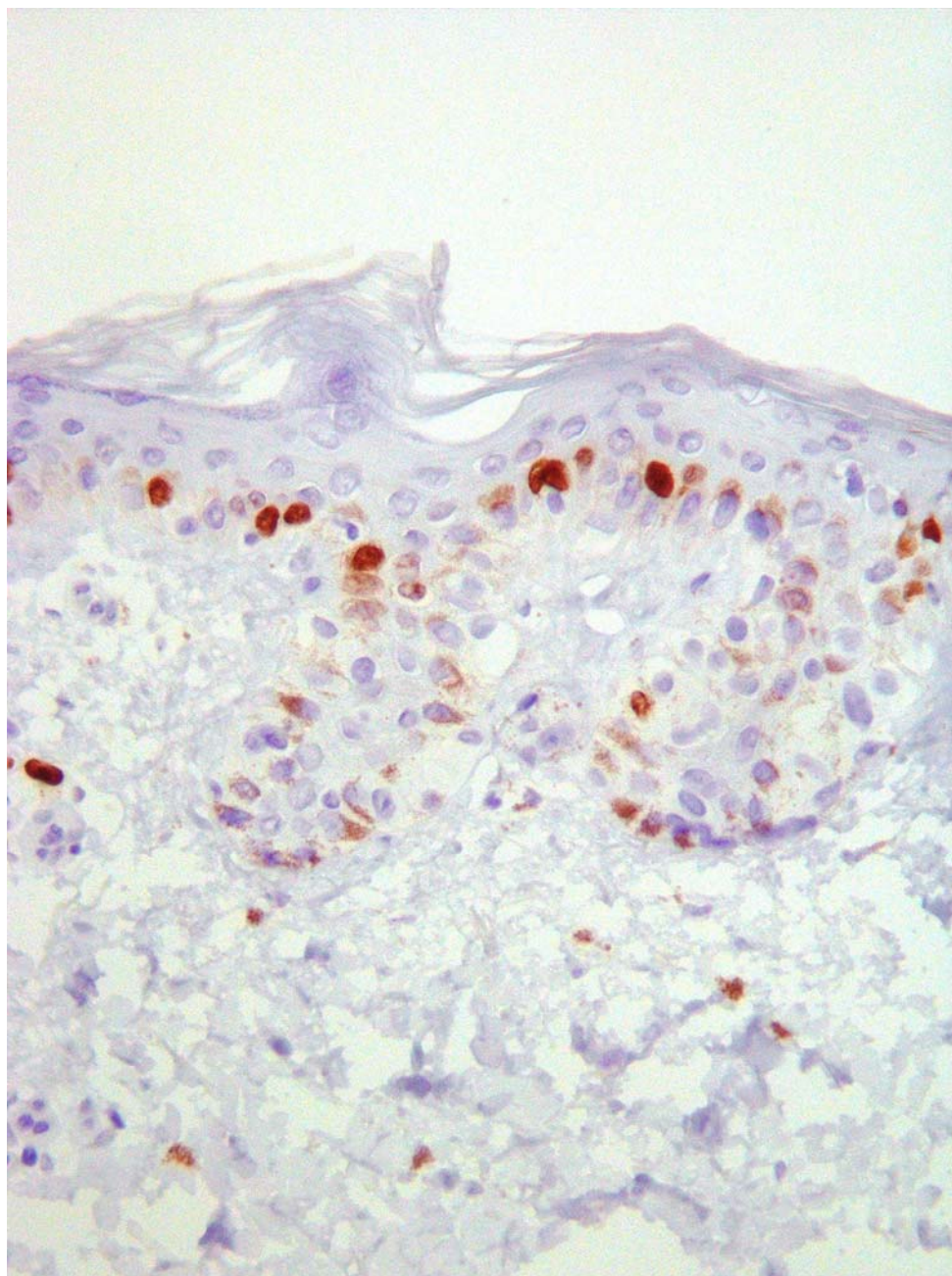
Ki67 je bio pozitivan u 39,7% (N=52) uzoraka planocelularnog karcinoma, dok je bio negativan u svim uzorcima zdrave kože (slike 20 i 21). U istraživanju je ispitivana i nuklearna i citoplazmatska reakcija na Ki67. Budući je izraženost citoplazmatskog Ki67 pronađena u samo jednom uzorku planocelularnog karcinoma, prikaz rezultata se odnosi samo na jezgrinu Ki67 reaktivnost.



**Slika 20.** Imunohistokemijska analiza izraženosti biljega proliferacije Ki67u planocelularnom karcinomu kože.

Opis: oko 80% tumorskih stanica slabo diferenciranog karcinoma pločastih stanica pokazuje proliferativnu aktivnost (imunohistokemijsko bojanje, Ki67, x400).



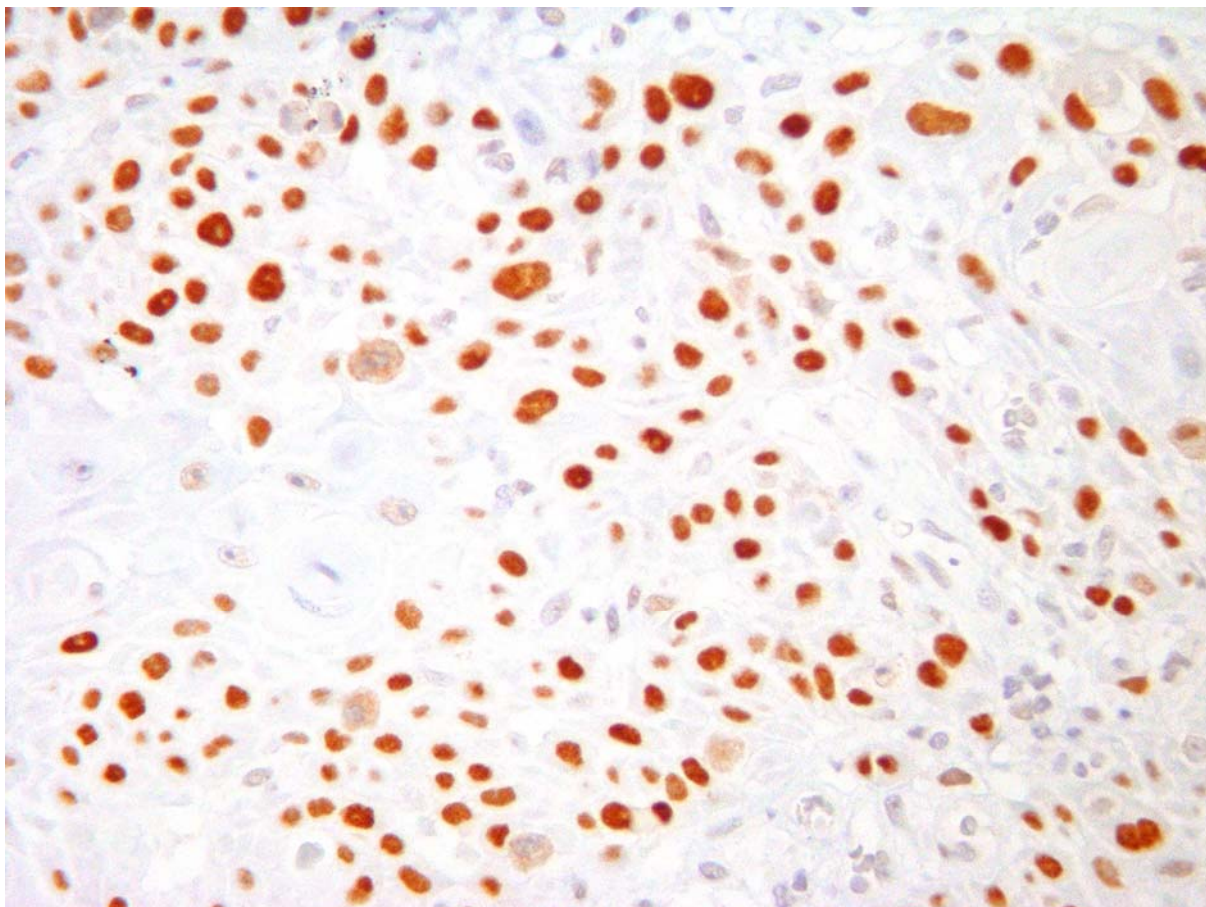


**Slika 21.** Imunohistokemijska analiza izraženosti biljega proliferacije Ki67 u zdravoj koži.

Opis: imunohistokemijsko bojanje na Ki67 prikazuje proliferativnu aktivnost u stanicama bazalnog sloja normalnog epitela (imunohistokemijsko bojanje, Ki67, x100).

**p53**

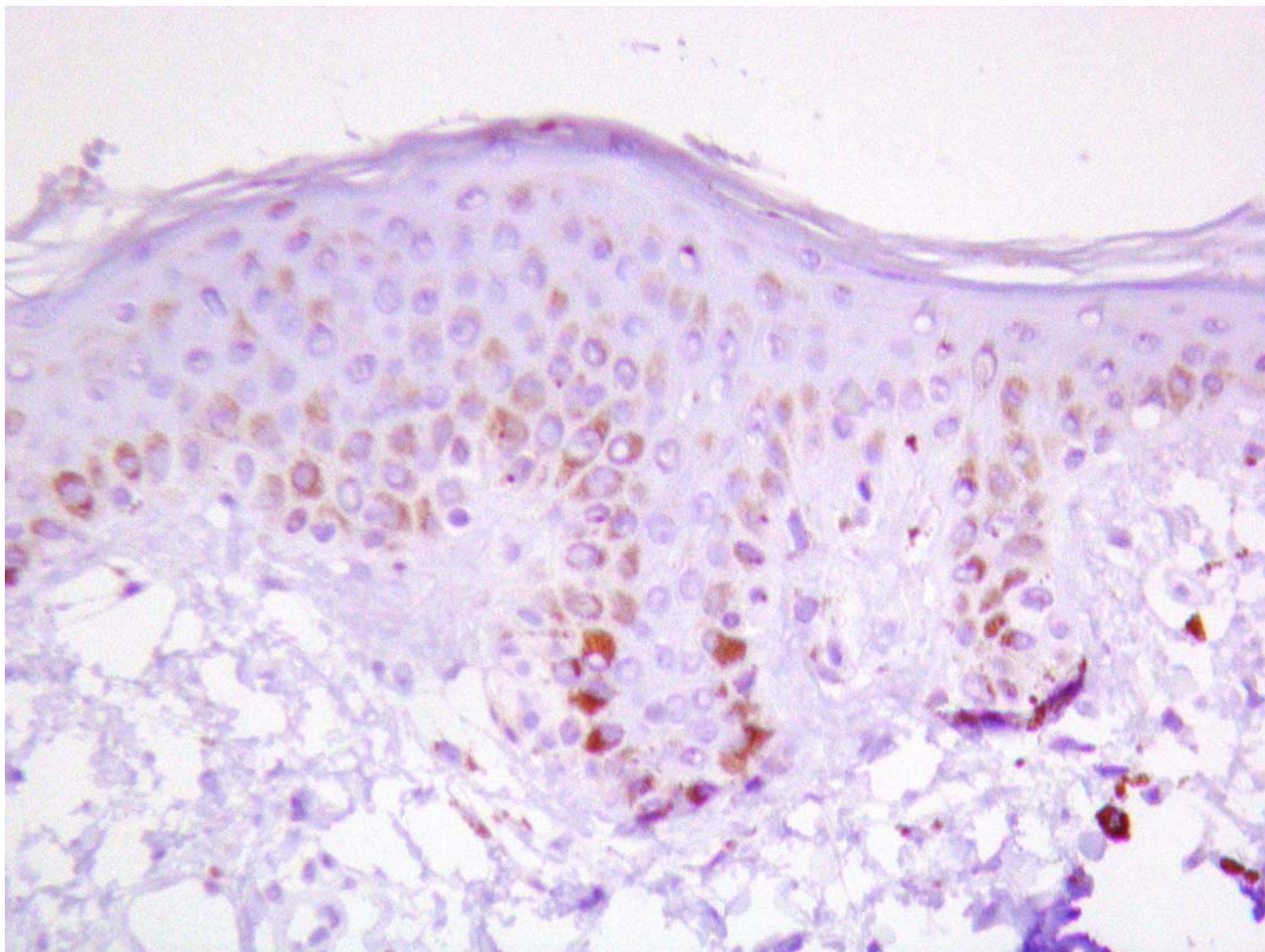
P53 je bio pozitivan u 55,7% (N=73) uzoraka planocelularnog karcinoma dok je bio negativan u svim uzorcima zdrave kože (slike 22 i 23).



**Slika 22.** Imunohistokemijska analiza izraženosti proteina p53u planocelularnom karcinomu kože.

Opis: gotovo sve stanice slabo diferenciranog karcinoma pločastih stanica pokazuju ekspresiju aberantnog proteina p53 (imunohistokemijsko bojanje, p53, x400).





**Slika 23.** Imunohistokemijska analiza izraženosti proteina p53u zdravoj koži.

Opis: u normalnom, zreлом višeslojnopločastom epitelu nema prisutnog aberantnog proteina p53 osim u malobrojnim stanicama bazalnog sloja (imunohistokemijsko bojanje, p53, x100).

Detaljni prikaz rezultata nalazi se u tablicama 5 i 6.

**Tablica 5.** Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože i zdravoj koži.

		Skupina			
		Karcinom		Zdrava koža	
		N	%	N	%
EGFR	Negativan	24	18,0%	134	100,0%
	Pozitivan	109	82,0%	0	,0%
HER2	Negativan	134	100,0%	134	100,0%
	Pozitivan	0	,0%	0	,0%
HER3	Negativan	0	,0%	0	,0%
	Pozitivan	134	100,0%	134	100,0%
Ki67: skupine*	Negativan	79	60,3%	134	100,0%
	Pozitivan	52	39,7%	0	,0%
p53: skupine*	Negativan	58	44,3%	134	100,0%
	Pozitivan	73	55,7%	0	,0%

\*P<0,001

Semikvantitativni prikaz rezultata izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze prikazan je u Tablici 6. Kako je HER2 bio negativan u svim uzorcima zdrave kože i planocelularnog karcinoma, rezultati obuhvaćaju prikaz rezultata izraženosti EGFR i HER3.

**Tablica 6.** Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR i HER3), semikvantitativno, ovisno o intenzitetu bojanja:

0- negativan; + slabo pozitivan, ++ srednje pozitivan, +++ jako pozitivan.

		Skupina			
		Karcinom		Zdrava koža	
		N	%	N	%
EGFR	Negativan	0	,0%	134	100,0%
	Slabo pozitivan	2	1,7%	0	,0%
	Srednje pozitivan	16	13,7%	0	,0%
	Jako pozitivan	99	84,6%	0	,0%
HER3	Negativan	0	,0%	0	,0%
	Slabo pozitivan	17	12,7%	0	,0%
	Srednje pozitivan	89	66,4%	134	100,0%
	Jako pozitivan	28	20,9%	0	,0%

### 5.2.1. Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu

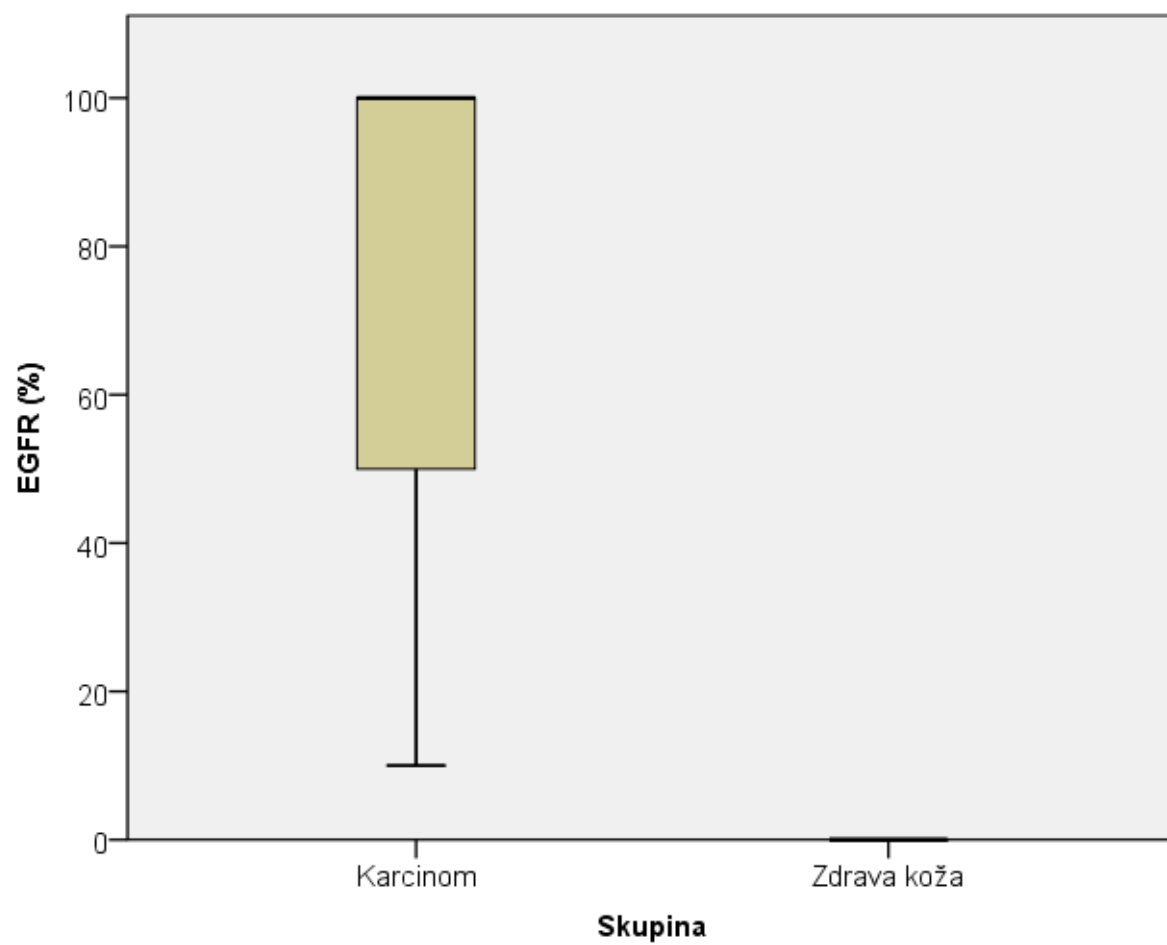
Analizom rezultata imunohistokemije utvrđene su značajne razlike između planocelularnog karcinoma i zdrave kože u izraženosti EGFR, Ki67 te p53 (sve vrijednosti su značajno veće u karcinomu) što je dodatno prikazano u tablici 7 te na slikama 24 do 26.

**Tablica 7.** Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu: Mann-Whitney U test.

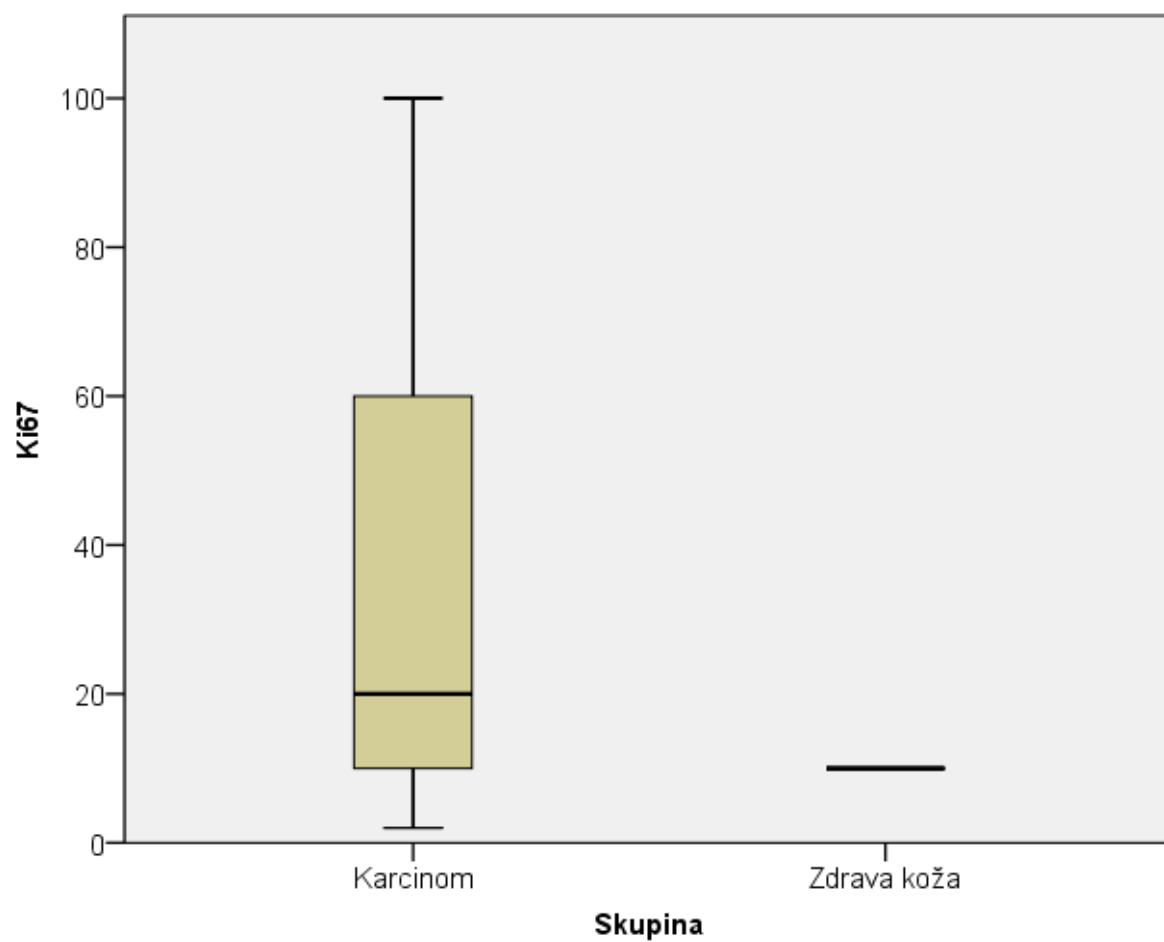
Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
						25.	Medijan	75.
EGFR (%)	Karcinom	133	78,65	31,35	10	100	50	100
	Zdrava koža	134	0	0	0	0	0	0
EGFR intenzitet	Karcinom	133	2,82	0,42	1	3	3	3
	Zdrava koža	134	0	0	0	0	0	0
HER2 (%)	Karcinom	134	0	0	0	0	0	0
	Zdrava koža	134	0	0	0	0	0	0
HER2 intenzitet	Karcinom	134	0	0	0	0	0	0
	Zdrava koža	134	0	0	0	0	0	0
HER3 (%)	Karcinom	134	100	0	100	100	100	100
	Zdrava koža	134	100	0	100	100	100	100
HER3 intenzitet	Karcinom	134	2,08	0,58	1	3	2	2
	Zdrava koža	134	2	0	2	2	2	2
Ki67	Karcinom	131	34,4	29,39	2	100	10	20
	Zdrava koža	134	10	0	10	10	10	10
p53	Karcinom	131	50,38	42,24	0	100	10	50
	Zdrava koža	134	0	0	0	0	0	0

	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	0,000	-15,343	<0,001
EGFR intenzitet	0,000	-15,779	<0,001
HER2	8978,000	,000	1,000
HER3 (%)	8978,000	,000	1,000
HER3 intenzitet	8241,000	-1,787	0,074
Ki67	4623,000	-7,895	<0,001
p53	1005,000	-13,787	<0,001

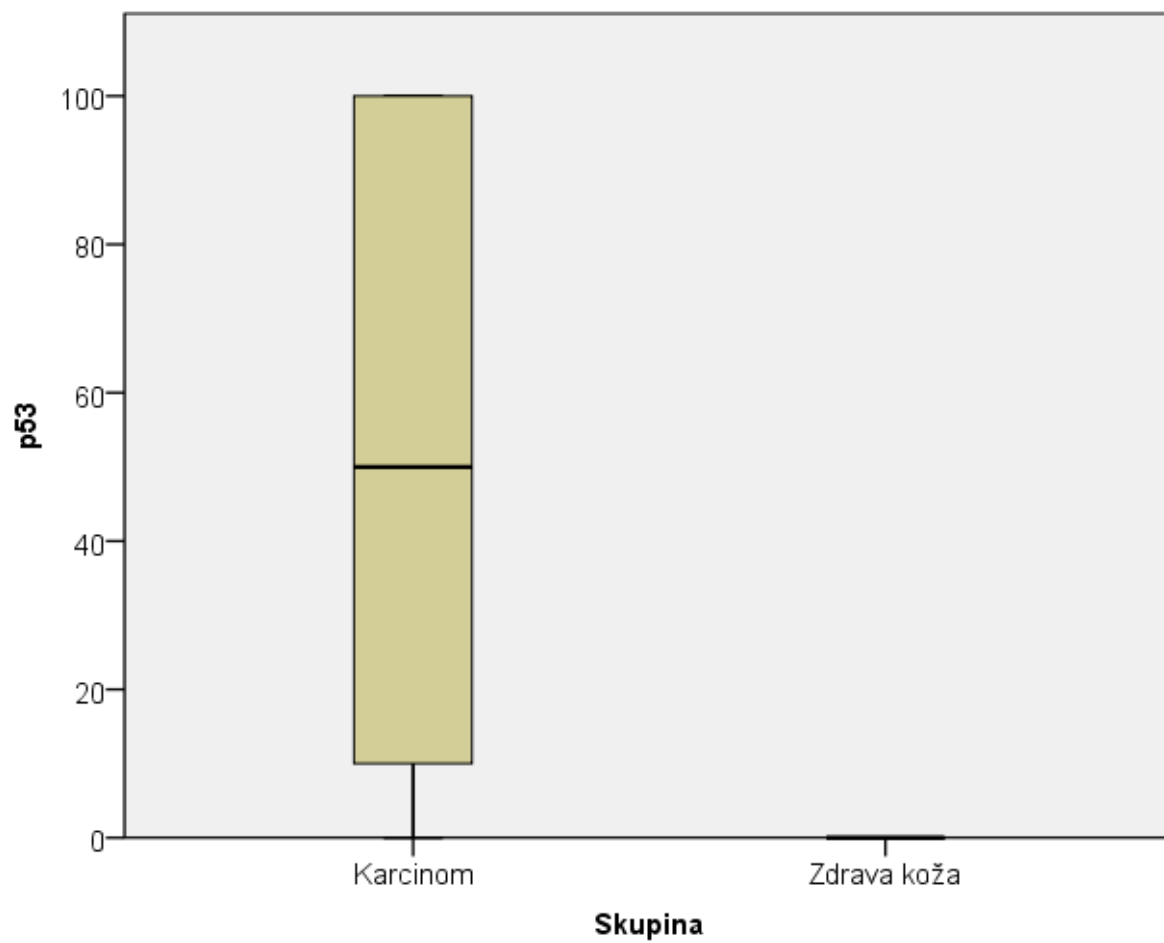
Legenda: Z= zdrava koža; P = planocelularni karcinom



**Slika 24.** Usporedba izraženosti EGFR u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.



**Slika 25.** Usporedba izraženosti biljega proliferacije Ki67 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.



**Slika 26.** Usporedba izraženosti p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.



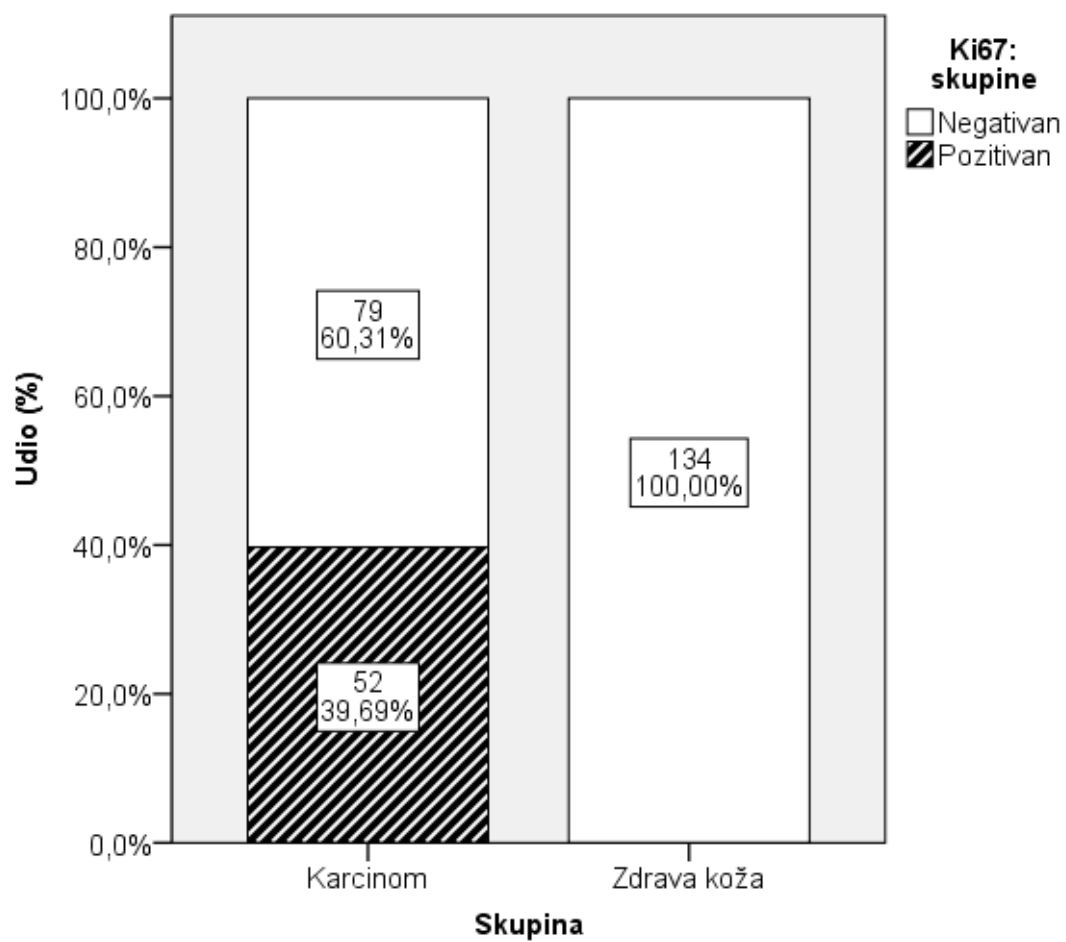
**Tablica 8.** Usporedba izraženosti biljega Ki67 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu: hi kvadrat test.

			Skupina		Ukupno
			Karcinom	Zdrava koža	
Ki67: skupine	Negativan	N	79	134	213
		%	60,3%	100,0%	80,4%
	Pozitivan	N	52	0	52
		%	39,7%	,0%	19,6%
Ukupno	N	131	134	265	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	66,176	1	<0,001
N	265		

Značajna je razlika u ekspresiji Ki67 između karcinoma i zdrave kože.

Ki67 je značajno češće pozitivan u karcinomu ( $P < 0,001$ ) što je dodatno prikazano na slici 27.



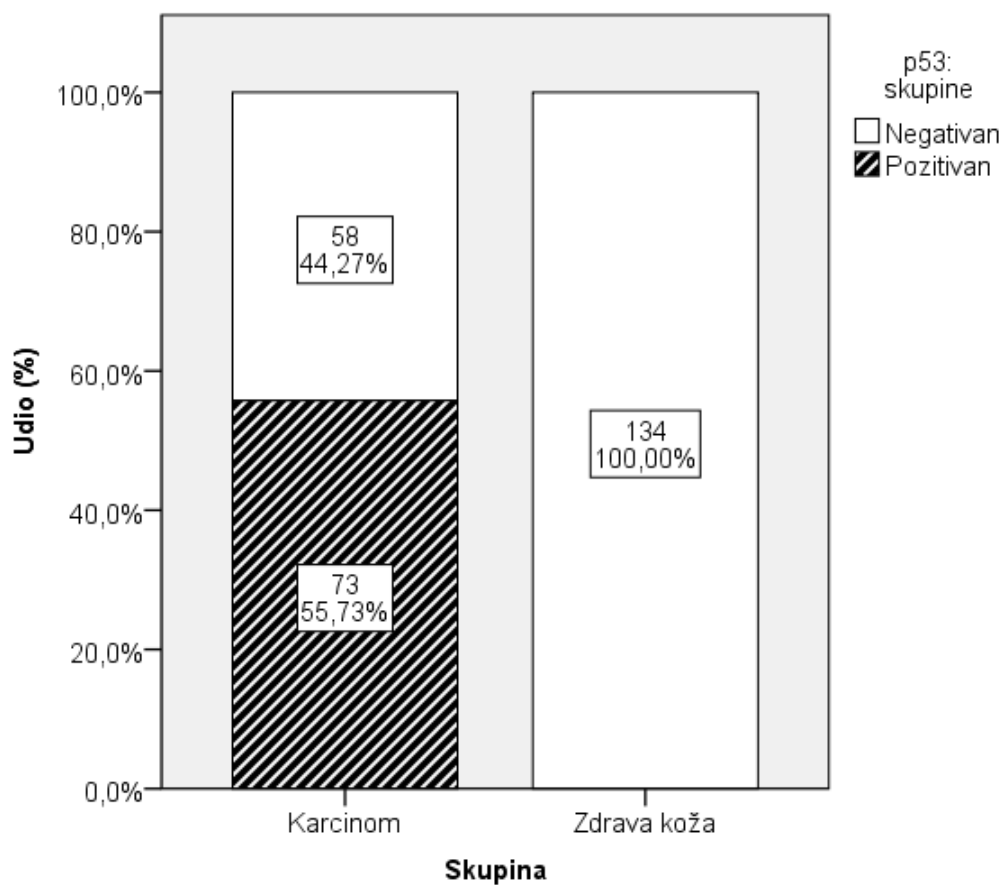
**Slika 27.** Usporedba izraženosti biljega Ki67 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.

**Tablica 9.** Usporedba izraženosti proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu: hi kvadrat test

			Skupina		Ukupno
			Karcinom	Zdrava koža	
p53: skupine	Negativan	N	58	134	192
		%	44,3%	100,0%	72,5%
	Pozitivan	N	73	0	73
		%	55,7%	,0%	27,5%
Ukupno		N	131	134	265
		%	100,0%	100,0%	100,0%

	Vrijednost	df	P
Hi kvadrat test	103,063	1	<0,001
N	265		

Značajna je razlika u ekspresiji p53 između karcinoma i zdrave kože. p53 je značajno češće pozitivan u karcinomu u odnosu na zdravu kožu ( $P < 0,001$ ) što je dodatno prikazano na slici 28.



**Slika 28.** Usporedba izraženosti proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na zdravu kožu.

### 5.3. Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože u odnosu na multipli planocelularni karcinom

Utvrđena je značajno veća izraženost ( u medijanima) EGFR, Ki 67 i p53 u multiplim tumorima u odnosu na solitarne. Nije utvđena razlika u izraženosti HER2 i HER3.

Detalji su prikazani u tablicama 10 i 11, te na slikama 29-31.

**Tablica 10.** Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože između multiplog i solitarnog planocelularnog karcinoma: Mann-Whitney U test.

	Tip tumora	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
							25.	Medijan	75.
EGFR (%)	Multipli	66	86,36	25,52	10,00	100,00	80,00	100,00	100,00
	Solitarni	67	71,04	34,73	10,00	100,00	30,00	90,00	100,00
EGFR intenzitet	Multipli	66	2,83	0,38	2,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Solitarni	67	2,81	0,47	1,00	3,00	3,00	3,00	3,00
HER2	Multipli	67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Solitarni	67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HER3 (%)	Multipli	67	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	Solitarni	67	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
HER3 intenzitet	Multipli	67	2,12	0,51	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
	Solitarni	67	2,04	0,64	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00
Ki67	Multipli	64	39,72	30,91	2,00	100,00	10,00	35,00	67,50
	Solitarni	67	29,33	27,12	5,00	100,00	10,00	20,00	50,00
p53	Multipli	65	58,92	41,62	0,00	100,00	10,00	70,00	100,00
	Solitarni	66	41,97	41,44	0,00	100,00	5,00	15,00	100,00

	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	1634,500	-2,92	0,003
EGFR intenzitet	2205,500	-0,04	0,969
HER2	2244,500	0,00	1,000
HER3 (%)	2244,500	0,00	1,000
HER3 intenzitet	2117,500	-0,68	0,498
Ki67	1722,500	-1,98	0,048
p53	1660,000	-2,29	0,022

Legenda: Z= zdrava koža; P = planocelularni karcinom

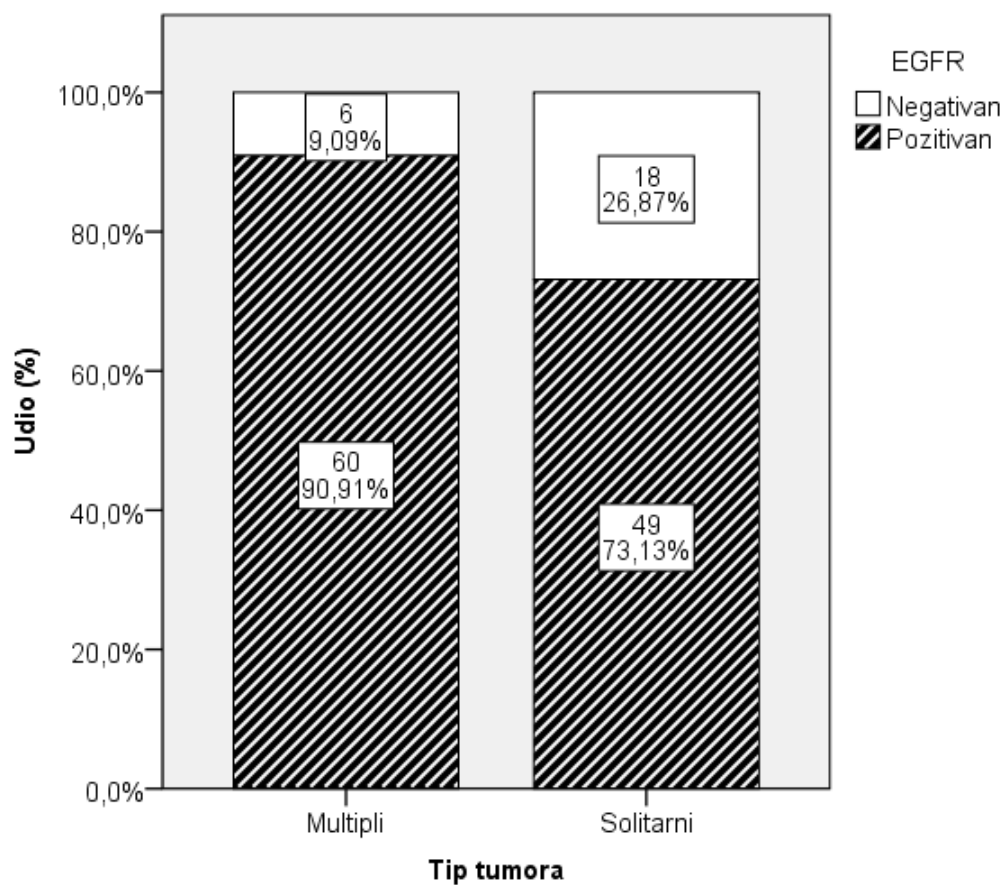
Medijani izraženosti EGFR (%),Ki67 te p53 su značajno veći u multiplim tumorima u odnosu na solitarne tumore.

**Tablica 11.** Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože između multiplog i solitarnog planocelularnog karcinoma: hi kvadrat test.

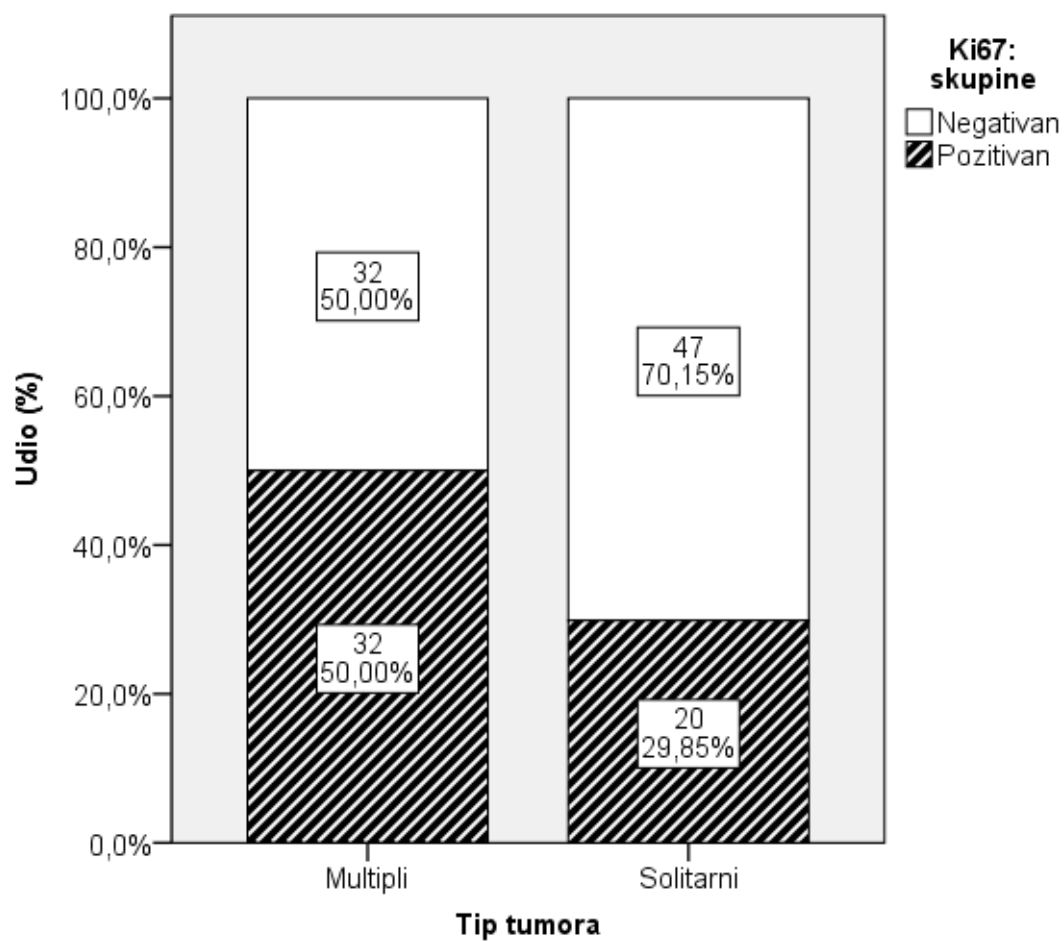
		Tip tumora			
		Multipli		Solitarni	
		N	%	N	%
EGFR*	Negativan	6	9,1%	18	26,9%
	Pozitivan	60	90,9%	49	73,1%
HER2	Negativan	67	100,0%	67	100,0%
	Pozitivan	0	,0%	0	,0%
HER3	Negativan	0	,0%	0	,0%
	Pozitivan	67	100,0%	67	100,0%
Ki67: skupine*	Negativan	32	50,0%	47	70,1%
	Pozitivan	32	50,0%	20	29,9%
p53: skupine*	Negativan	23	35,4%	35	53,0%
	Pozitivan	42	64,6%	31	47,0%

\*P<0,05

Slično kao i u tablici 11, ako se uzme u obzir samo pozitivitet ili negativitet nalaza pokazuju se značajne razlike u izraženosti EGFR-a, Ki67 i p53 s većom učestalošću ekspresije u multiplih tumorima (slike 29-31).

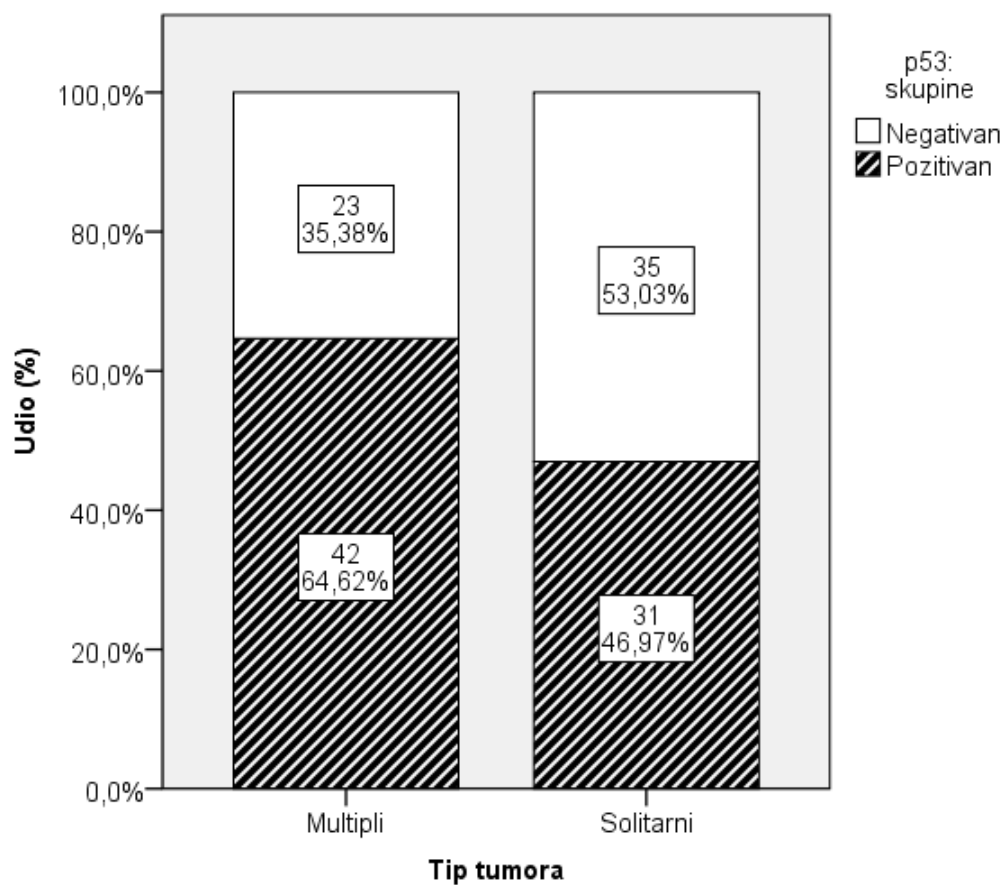


**Slika 29.** Usporedba izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR) u solitarnom i multiplom planocelularnom karcinomu kože.



**Slika 30.** Usporedba izraženosti biljega Ki67 u solitarnom i multiplom planocelularnom karcinomu kože.



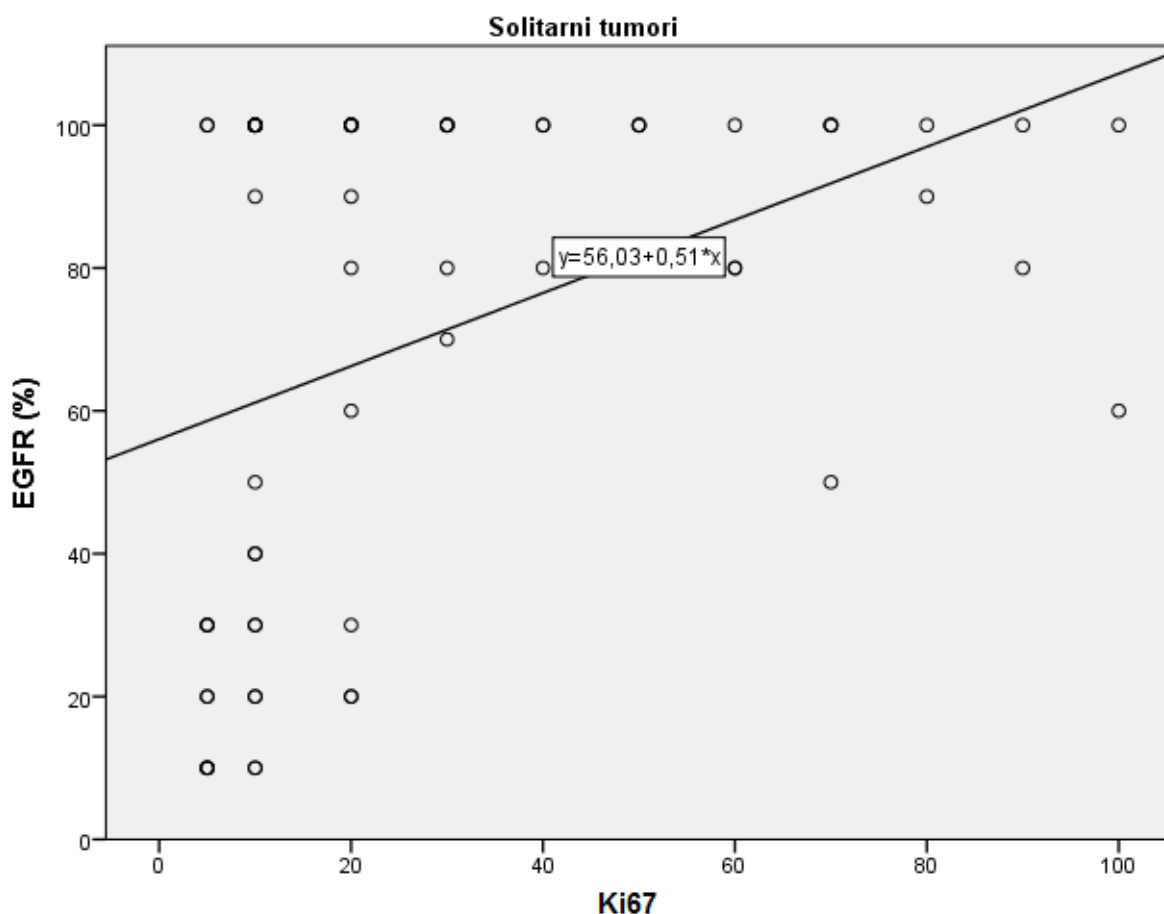


**Slika 31.** Usporedba izraženosti proteina p53 u solitarnom i multiplom planocelularnom karcinomu kože.

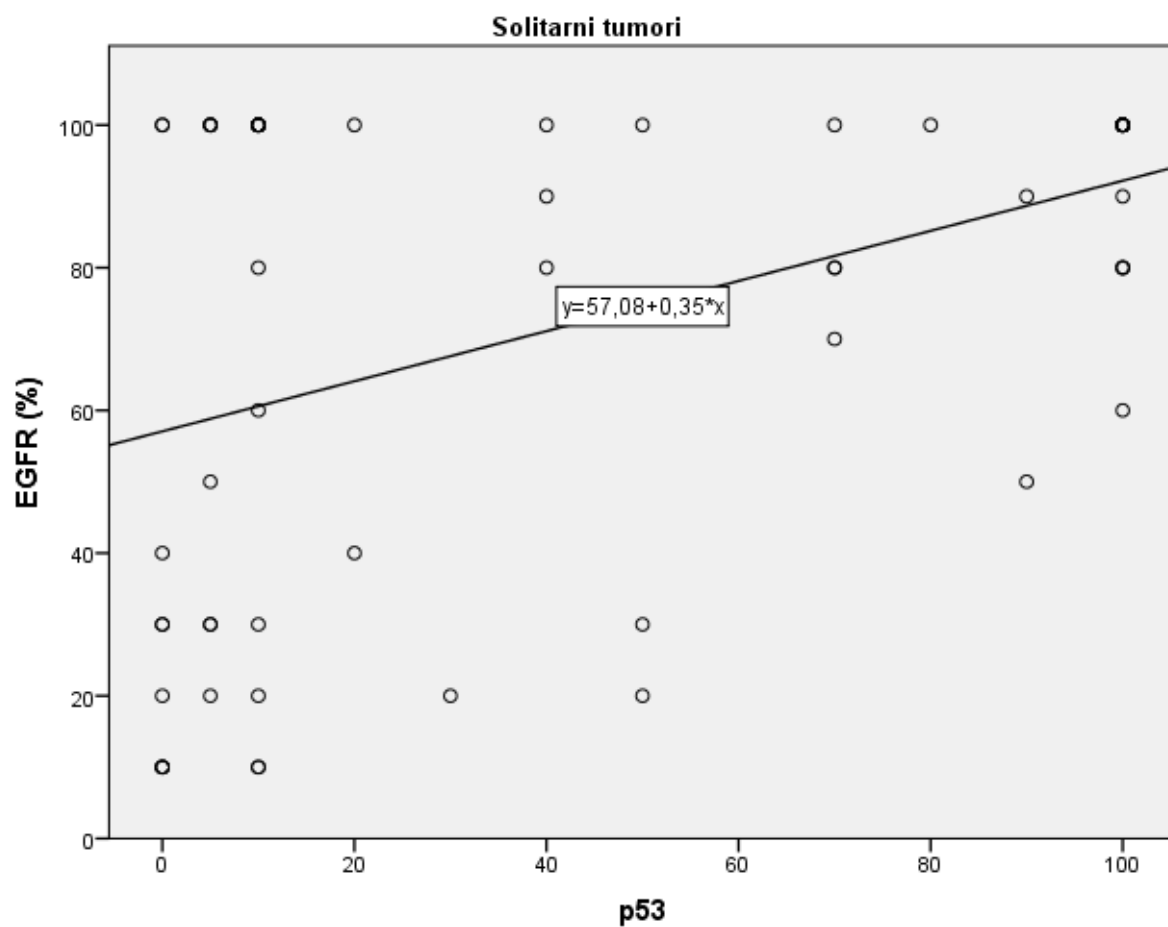
#### 5.4. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s pojavom multiplih tumora kože, fototipom kože, te anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju i broju sunčevih opeklinu u djetinjstvu

##### 5.4.1. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s Ki67 imunoreaktivnošću te izraženošću proteina p53 u solitarnom, multiplom planocelularnom karcinomu, kao i u zdravoj koži

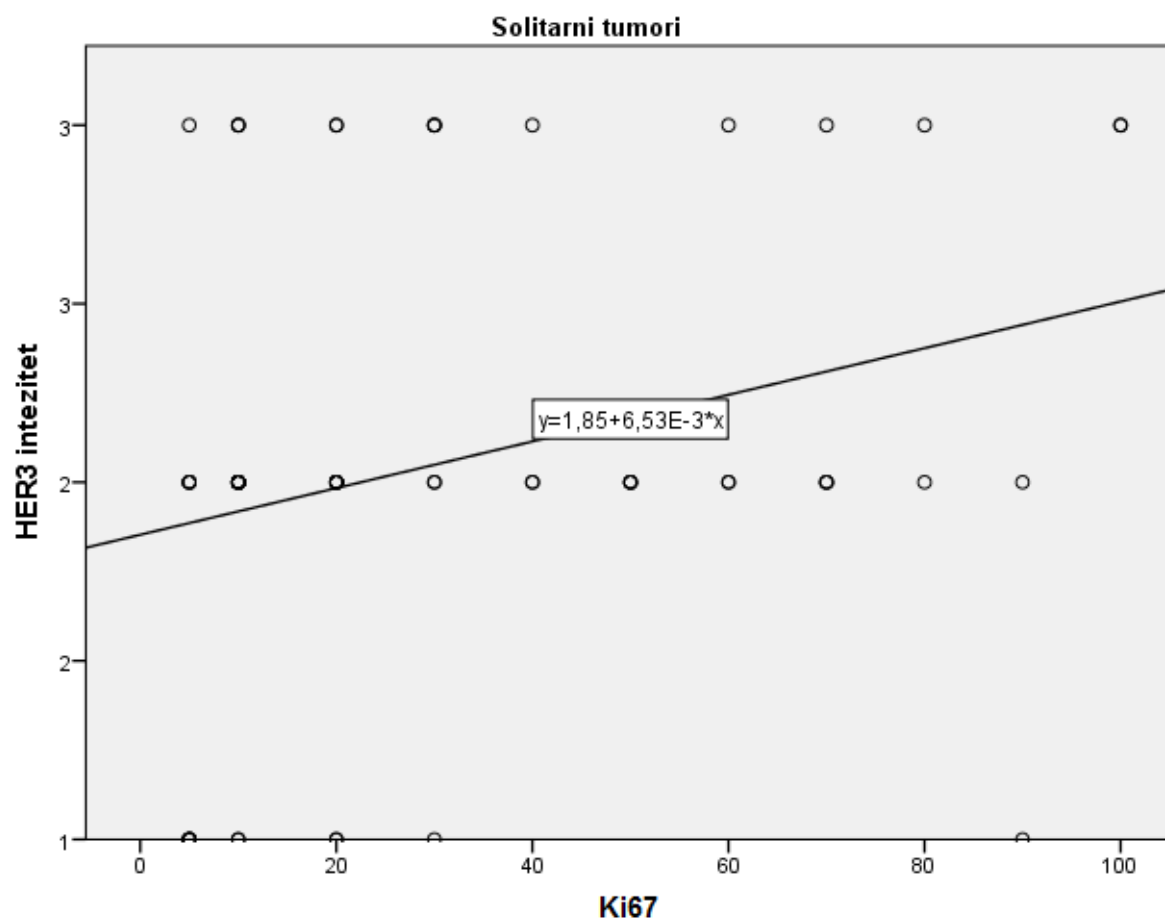
Istraživanjem je utvrđeno da EGFR (%) i HER3 intenzitet značajno pozitivno koreliraju s Ki67 i p53 u solitarnom tumoru (slike 32-35), ali ne i u multiplim tumorima (slike 36-39). Na slikama su prikazani i regresijski pravci kako bi se lakše uočio smjer korelacije.



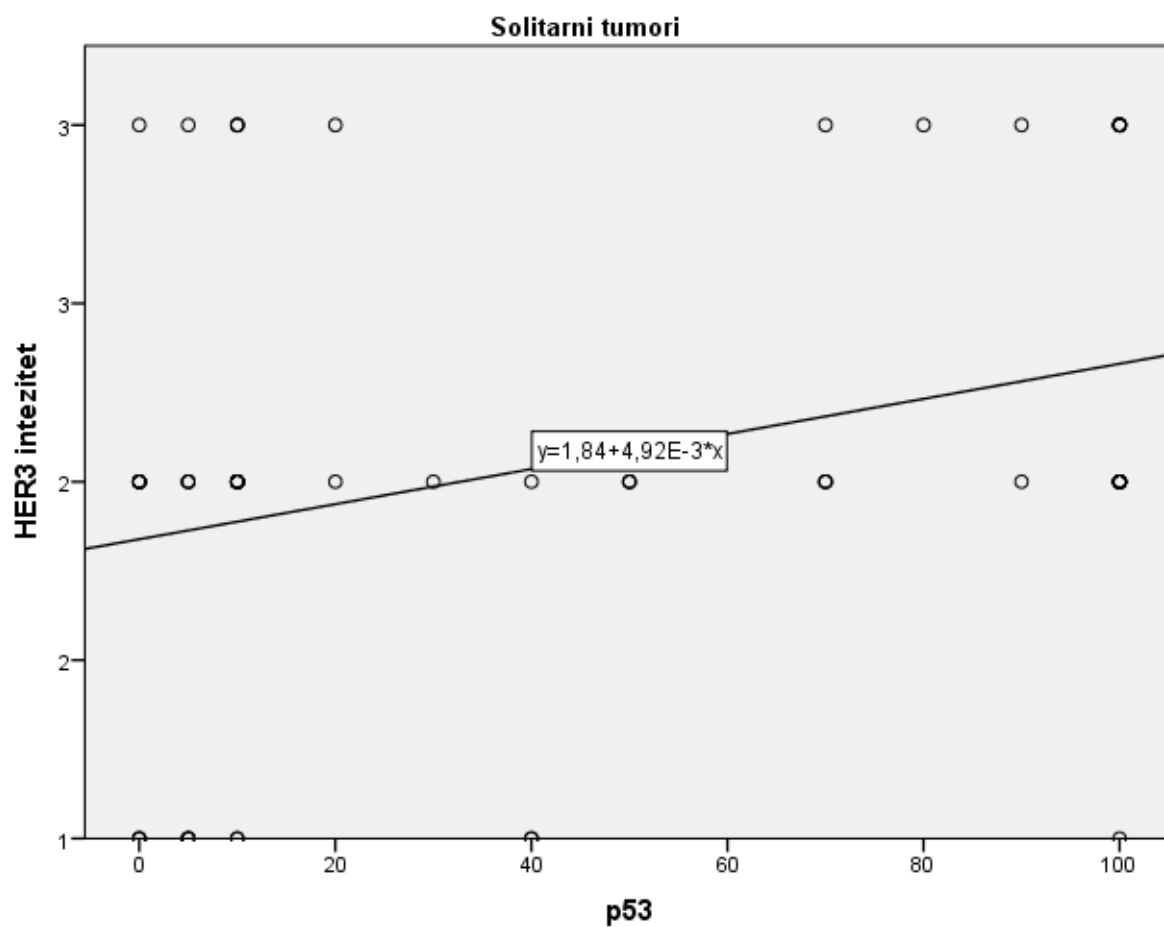
**Slika 32.** Povezanost izraženosti EGFR (%) i Ki67 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.



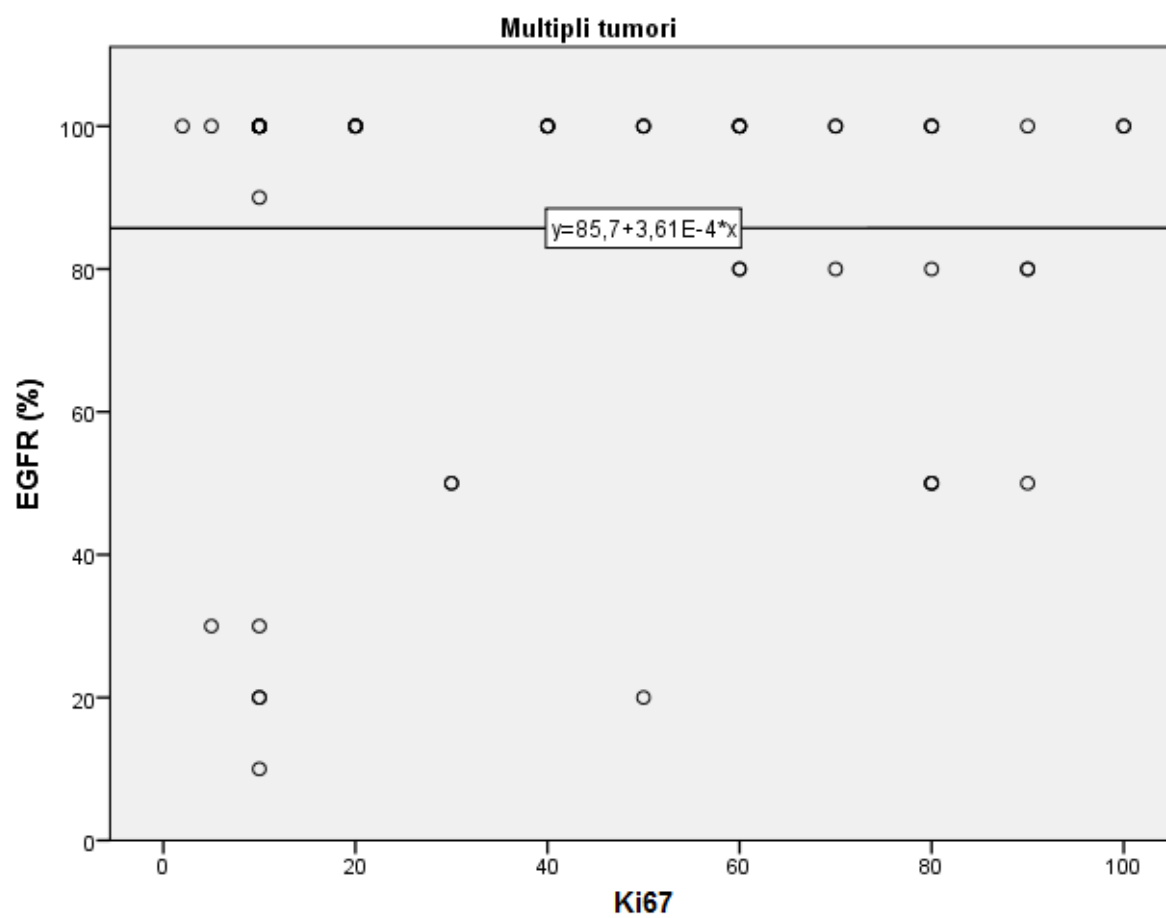
**Slika 33.** Povezanost izraženosti EGFR (%) i p53 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.



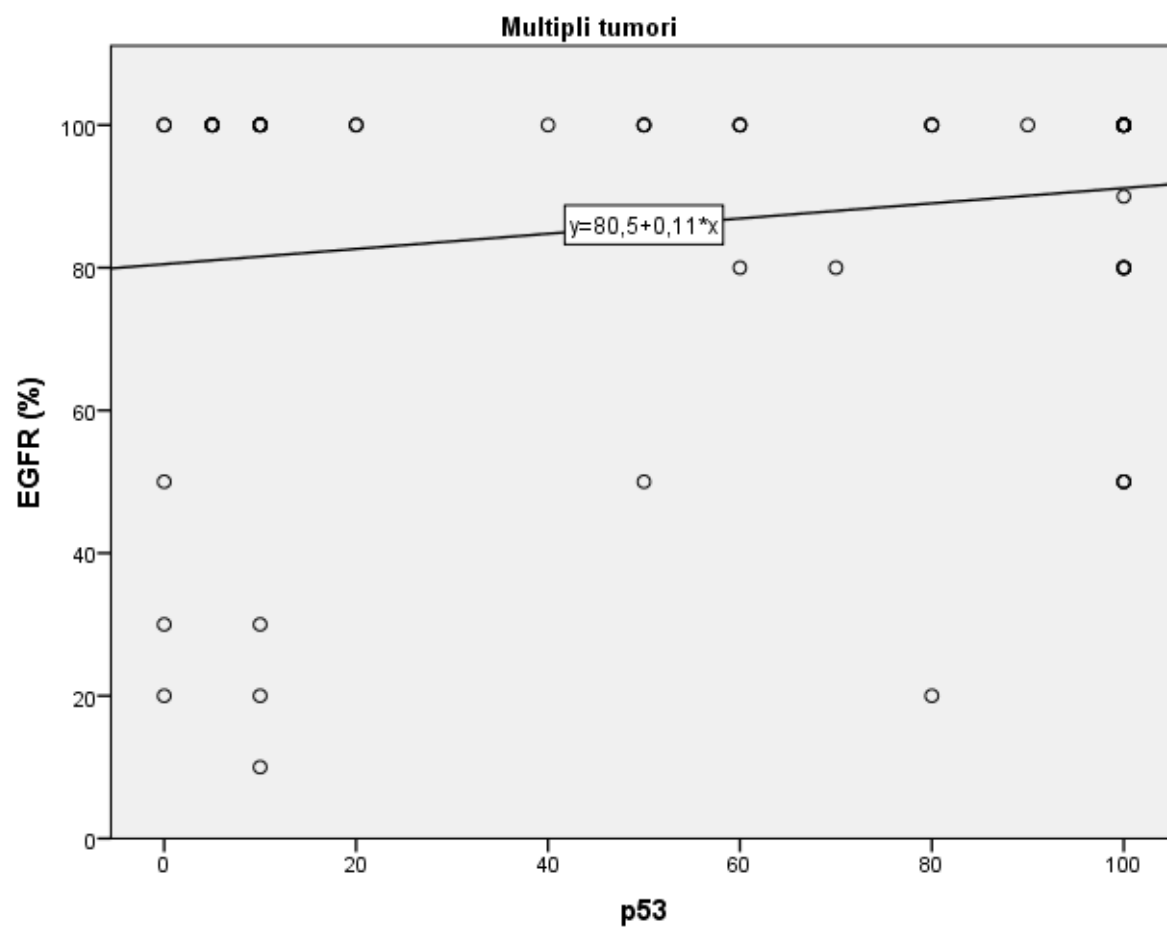
**Slika 34.** Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i Ki67 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.



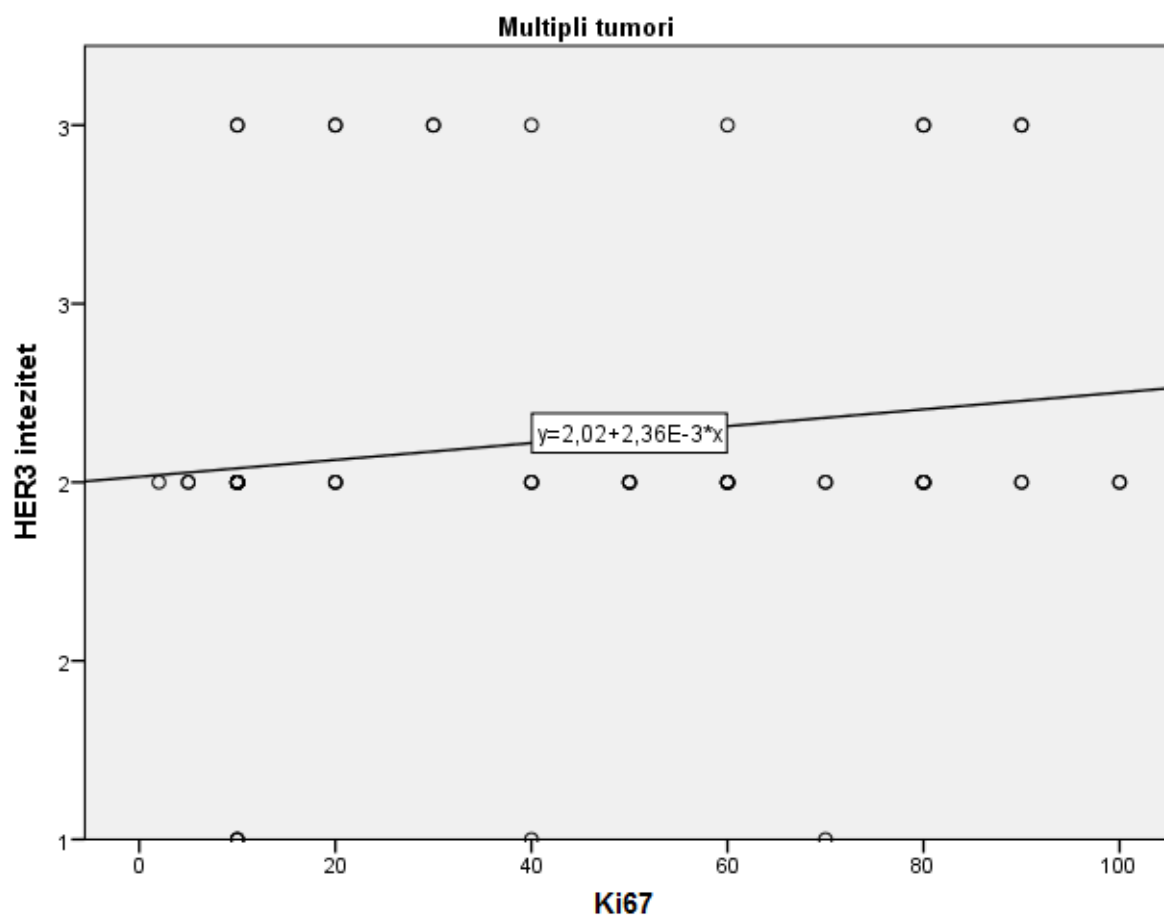
**Slika 35.** Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i p53 u solitarnom planocelularnom karcinomu kože.



**Slika 36.** Povezanost izraženosti EGFR (%) i Ki67 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.

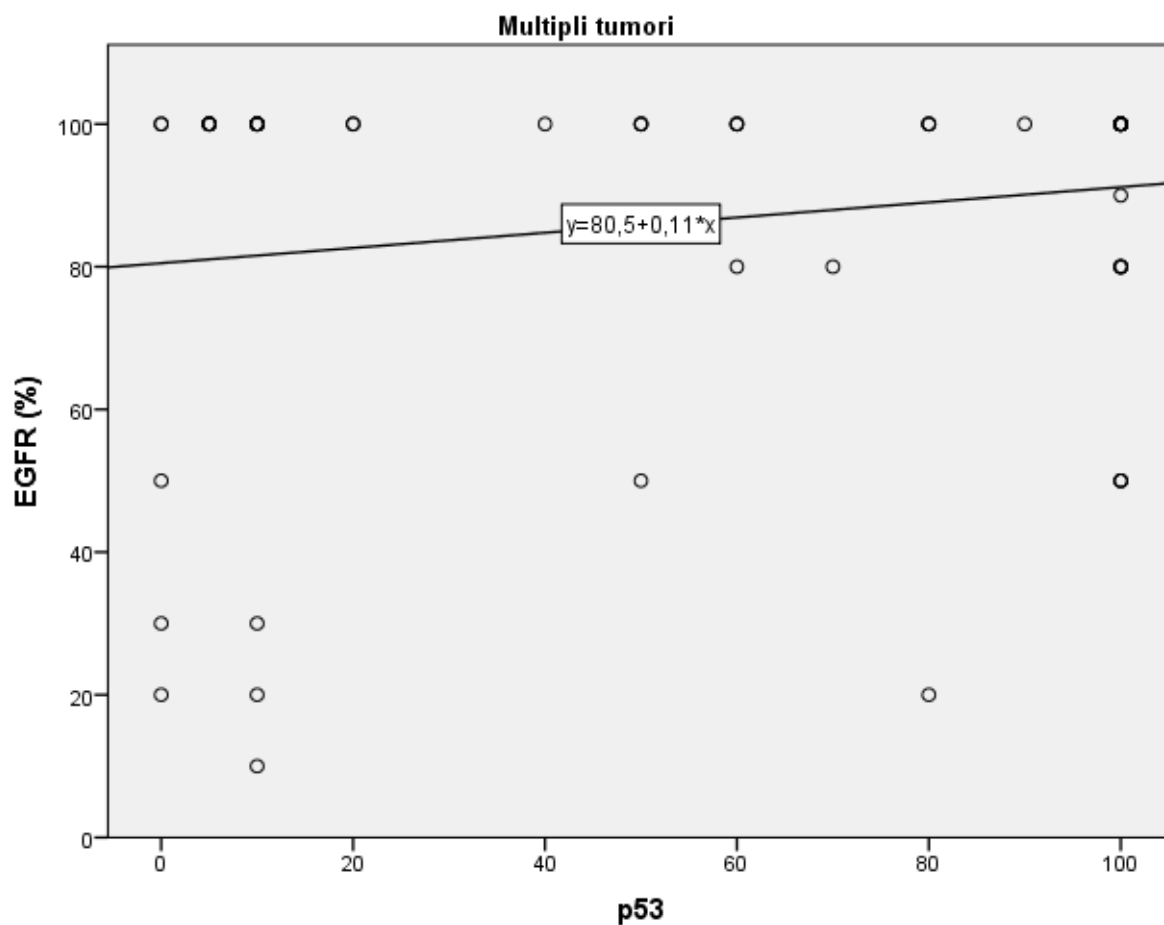


**Slika 37.** Povezanost izraženosti EGFR (%) i p53 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.



**Slika 38.** Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i Ki67 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.





**Slika 39.** Povezanost izraženosti HER3 (intenzitet) i p53 u multiplom planocelularnom karcinomu kože.

Izraženost citoplazmatskog Ki67 pronađena je u samo jednom uzorku planocelularnog karcinoma.

Na zdravoj koži nisu uočene promjene u intenzitetu i udjelu izraženosti pojedinih receptora i markera tako da nije bilo moguće učiniti procjenu povezanosti.

Detalji su prikazani u tablici 12.

**Tablica 12.** Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s nuklearnom, membranskom i citoplazmatskom Ki67 imunoreaktivnošću te izraženošću proteina p53 u solitarnom, multiplom planocelularnom karcinomu, kao i u zdravoj koži\*.

		Multipli		Solitarni	
		ki67	p53	ki67	p53
EGFR (%)	Korelacijski koeficijent	-0,120	0,046	0,430	0,387
	P	0,175	0,359	<0,001	0,001
	N	63	64	67	66
EGFR intenzitet	Korelacijski koeficijent	-0,220	-0,050	-0,067	-0,115
	P	0,042	0,347	0,296	0,180
	N	63	64	67	66
HER3 intenzitet	Korelacijski koeficijent	0,177	0,079	0,337	0,328
	P	0,081	0,265	0,003	0,004
	N	64	65	67	66

\*Na zdravoj koži nema promjena u intenzitetu i udjelu izraženosti pojedinih receptora i markera tako da nije moguća procjena povezanosti.

### 5.4.2. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože

Analizom rezultata istraživanja uočena je značajna razlika između pojedinih fototipova kože (u postotku) izraženosti EGFR-a (veće vrijednosti u svjetlijem tipu kože), tablice 13 i 14.

**Tablica 13.** Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože: Mann-Whitney U test.

Fototip	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
						25.	Medijan	75.
EGFR (%)	Tip 2	82	81,71	30,30	10,00	100,00	50,00	100,00
	Tip 3	51	73,73	32,68	10,00	100,00	40,00	80,00
EGFR intenzitet	Tip 2	82	2,85	0,36	2,00	3,00	3,00	3,00
	Tip 3	51	2,76	0,51	1,00	3,00	3,00	3,00
HER2	Tip 2	83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Tip 3	51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HER3 (%)	Tip 2	83	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	Tip 3	51	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
HER3 intenzitet	Tip 2	83	2,10	0,53	1,00	3,00	2,00	2,00
	Tip 3	51	2,06	0,65	1,00	3,00	2,00	2,00
Ki67	Tip 2	80	33,59	30,11	2,00	100,00	10,00	20,00
	Tip 3	51	35,69	28,46	5,00	100,00	10,00	30,00
p53	Tip 2	80	50,50	42,95	0,00	100,00	10,00	50,00
	Tip 3	51	50,20	41,52	0,00	100,00	10,00	50,00

	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	1624,0	-2,433	0,015
EGFR intenzitet	1975,0	-0,833	0,405
HER2	2116,5	0,000	1,000
HER3 (%)	2116,5	0,000	1,000
HER3 intenzitet	2061,0	-0,305	0,760
Ki67	1876,5	-0,786	0,432
p53	2009,5	-0,148	0,883

Legenda: Z= zdrava koža; P = planocelularni karcinom

**Tablica 14.** Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s fototipom kože: hi kvadrat test.

		Fototip			
		Tip 2		Tip 3	
		N	%	N	%
EGFR	Negativan	13	15,9%	11	21,6%
	Pozitivan	69	84,1%	40	78,4%
HER2	Negativan	83	100,0%	51	100,0%
	Pozitivan	0	,0%	0	,0%
HER3	Negativan	0	,0%	0	,0%
	Pozitivan	83	100,0%	51	100,0%
Ki67: skupine	Negativan	48	60,0%	31	60,8%
	Pozitivan	32	40,0%	20	39,2%
p53: skupine	Negativan	37	46,3%	21	41,2%
	Pozitivan	43	53,8%	30	58,8%

Nema značajnih razlika u pozitivitetu i negativitetu izraženosti pojedinih receptora i biljega u odnosu na fototip kože.

### 5.4.3. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju

Pronađeni su značajno veći medijani ekspresije EGFR-a i Ki67u ispitanika koji su tijekom života bili izloženi pojačanom UV zračenju.

**Tablica 15.** Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju: Mann-Whitney U test.

UV zračenje tijekom života	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
						25.	Medijan	75.
EGFR (%)	Da	125	80,32	30,37	10,00	100,00	65,00	100,00
	Ne	8	52,50	36,94	10,00	100,00	15,00	45,00
EGFR intenzitet	Da	125	2,81	0,43	1,00	3,00	3,00	3,00
	Ne	8	3,00	0,00	3,00	3,00	3,00	3,00
HER2	Da	126	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Ne	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HER3 (%)	Da	126	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	Ne	8	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
HER3 intenzitet	Da	126	2,10	0,56	1,00	3,00	2,00	2,00
	Ne	8	1,75	0,71	1,00	3,00	1,00	2,00
Ki67	Da	123	35,46	29,21	2,00	100,00	10,00	20,00
	Ne	8	18,13	29,15	5,00	90,00	5,00	10,00
p53	Da	123	51,87	41,82	0,00	100,00	10,00	50,00
	Ne	8	27,50	44,88	0,00	100,00	0,00	5,00

	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	280,5	-2,339	0,019
EGFR intenzitet	412,0	-1,292	0,196
HER2	504,0	0,000	1,000
HER3 (%)	504,0	0,000	1,000
HER3 intenzitet	359,5	-1,627	0,104
Ki67	252,5	-2,344	0,019
p53	294,0	-1,950	0,051

Legenda: Z= zdrava koža; P = planocelularni karcinom

**Tablica 16.** Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s anamnestičkim podacima o pojačanoj izloženosti UV zračenju: hi kvadrat test.

		UV zračenje tijekom života			
		Da		Ne	
		N	%	N	%
EGFR	Negativan	21	16,8%	3	37,5%
	Pozitivan	104	83,2%	5	62,5%
HER2	Negativan	126	100,0%	8	100,0%
	Pozitivan	0	,0%	0	,0%
HER3	Negativan	0	,0%	0	,0%
	Pozitivan	126	100,0%	8	100,0%
Ki67: skupine	Negativan	72	58,5%	7	87,5%
	Pozitivan	51	41,5%	1	12,5%
p53: skupine	Negativan	52	42,3%	6	75,0%
	Pozitivan	71	57,7%	2	25,0%

Nema značajnih razlika u pozitivitetu i negativitetu izraženosti pojedinih receptora i biljega u odnosu na UV zračenje tijekom života.

#### 5.4.4. Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu

Sukladno podacima prikazanim u tablici 17, pronađeni su značajno veći medijani izraženosti EGFR-a u ispitanika koji su tijekom života imali više od 3 opekline uzrokovane sunčevim zračenjem.

**Tablica 17.** Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu: Mann-Whitney U test.

Broj sunčevih opeklinu u djetinjstvu	N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Percentile		
						25.	Medijan	75.
EGFR (%)	≥3	69	85,22	26,49	10,00	100,00	80,00	100,00
	<3	64	71,56	34,70	10,00	100,00	30,00	90,00
EGFR intenzitet	≥3	69	2,81	0,39	2,00	3,00	3,00	3,00
	<3	64	2,83	0,46	1,00	3,00	3,00	3,00
HER2	≥3	70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	<3	64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
HER3 (%)	≥3	70	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	<3	64	100,00	0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
HER3 intenzitet	≥3	70	2,13	0,54	1,00	3,00	2,00	2,00
	<3	64	2,03	0,62	1,00	3,00	2,00	2,00
Ki67	≥3	67	37,79	31,07	2,00	100,00	10,00	20,00
	<3	64	30,86	27,31	5,00	100,00	10,00	20,00
p53	≥3	68	56,69	41,72	0,00	100,00	10,00	60,00
	<3	63	43,57	42,06	0,00	100,00	5,00	20,00

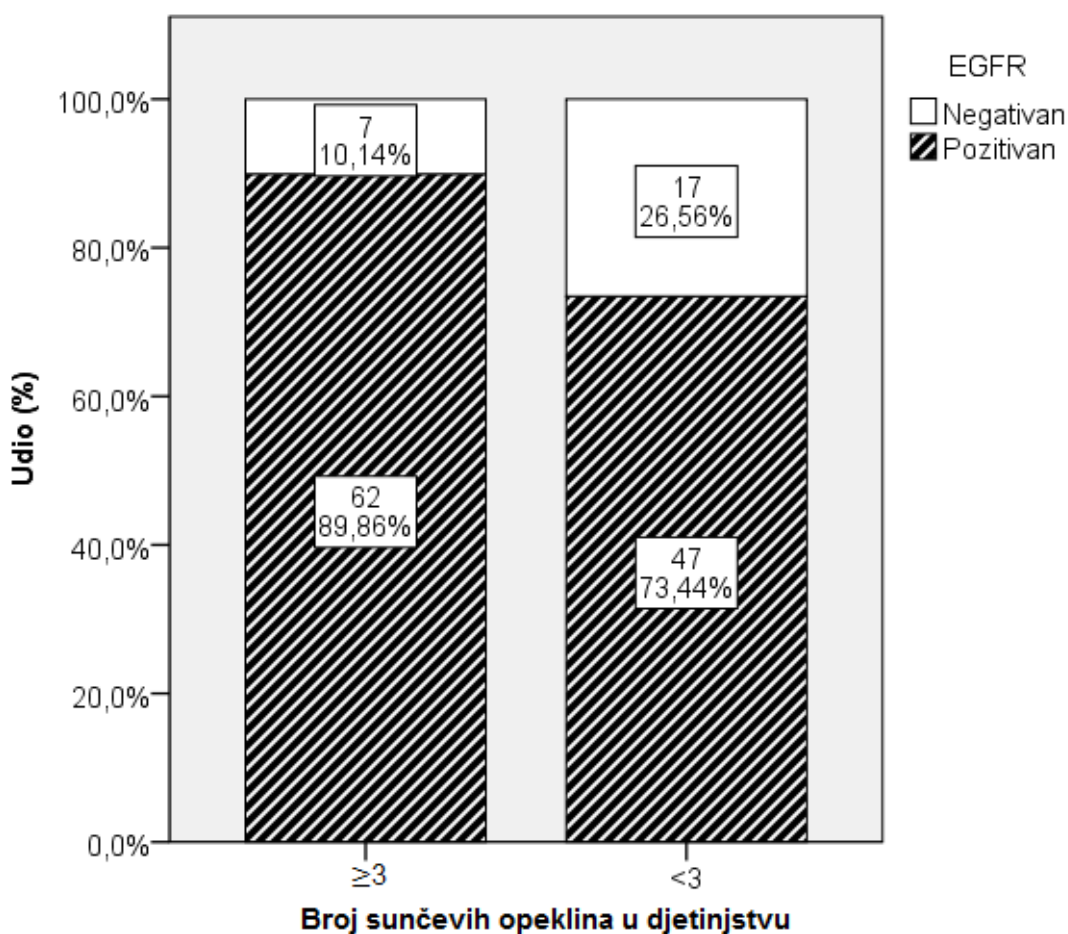
	Mann-Whitney U	Z	P
EGFR (%)	1646,0	-2,850	0,004
EGFR intenzitet	2115,5	-0,646	0,518
HER2	2240,0	0,000	1,000
HER3 (%)	2240,0	0,000	1,000
HER3 intenzitet	2065,5	-0,932	0,351
Ki67	1898,0	-1,153	0,249
p53	1757,5	-1,815	0,069

Legenda: Z= zdrava koža; P = planocelularni karcinom

**Tablica 18.** Povezanost izraženosti transmembranskih receptora tirozin kinaze s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu: hi kvadrat test.

		Broj sunčevih opeklinu u djetinjstvu			
		$\geq 3$		$< 3$	
		N	%	N	%
EGFR*	Negativan	7	10,1%	17	26,6%
	Pozitivan	62	89,9%	47	73,4%
HER2	Negativan	70	100,0%	64	100,0%
	Pozitivan	0	,0%	0	,0%
HER3	Negativan	0	,0%	0	,0%
	Pozitivan	70	100,0%	64	100,0%
Ki67: skupine	Negativan	36	53,7%	43	67,2%
	Pozitivan	31	46,3%	21	32,8%
p53: skupine	Negativan	26	38,2%	32	50,8%
	Pozitivan	42	61,8%	31	49,2%

\*P&lt;0,05

**Slika 40.** Povezanost izraženosti EGFR s brojem sunčevih opeklinu u djetinjstvu.



### 5.5. Predikcije patohistološkog stupnja tumora (po Brodersu) s obzirom na izraženost pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53

Analizom dobivenih rezultata istraživanja, uz pomoć regresijskog modela predikcije stupnja tumora kao jedini značajni prediktor se izdvaja izraženost Ki67. Veća izraženost ovog biljega proliferacije povezana je s većim patohistološkim stupnjem diferencijacije tumora, po Brodersu (Tablica 19).

**Tablica 19.** Regresijski model predikcije patohistološkog stupnja tumora (po Brodersu) s obzirom na izraženosti pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53.

	Nestandardizirani koeficijenti		Standardizirani koeficijenti	t	P	95,0% CI	
	B	Standardna greška	Beta			Donji	Gornji
EGFR (%)	0,00	0,00	-0,10	-1,25	0,214	-0,01	0,00
EGFR intenzitet	0,05	0,11	0,03	0,40	0,687	-0,18	0,27
HER3 intenzitet	-0,02	0,09	-0,02	-0,23	0,820	-0,19	0,15
<b>Ki67</b>	0,01	0,00	<b>0,52</b>	5,50	<b>&lt;0,001</b>	0,01	0,01
p53	0,00	0,00	0,04	0,45	0,652	0,00	0,00

Model je statistički značajan ( $P < 0,001$ ), objašnjava 27,4% varijance patohistološkog stupnja tumora (po Brodersu) te kao jedini značajni prediktor (kontroliran na ostale u modelu) izdvaja se izraženost Ki67: veća izraženost je povezana s većim patohistološkim stupnjem diferencijacije tumora, kontrolirano na ostale prediktorske varijable u modelu.

### 5.6. Predikcija rizika nastanka multiplih tumora s obzirom na izraženost pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53 te pojedine anamnestičke podatke

Binarni logistički model predikcije rizika nastanka multiplih tumora je statistički značajan ( $P=0,039$ ) i objašnjava 17% varijance.

Najjači značajni prediktor nastanka multiplih tumora (kontroliran na ostale varijable u modelu) je starija dob (OR od 5,83 do 10,08 u usporedbi s referentnom skupinom mlađih od 60 godina), a nakon toga veća izraženost Her1 % (OR=1,02; 95% CI 1,01-1,03).

Ovi podaci nam govore o kliničkim/terapijskim smjernicama koje bi u prevenciji nastanka multiplih tumora trebale biti usmjerene na stariju dobnu skupinu i to prvenstveno nakon 70. godine u kojoj nalazimo povećanu izraženost HER1.

**Tablica 20.** Regresijski model predikcije rizika nastanka multiplih tumora s obzirom na izraženosti pojedinih receptora tirozin kinaze, Ki67 i p53 te pojedine anamnestičke podatke: binarna logistička regresija.

	OR	95% CI		P
		Donji	Gornji	
Dobna skupina: ≤60 godina (REF)				0,103
61-70 godina	5,52	0,90	34,02	0,065
71-80 godina	5,83	1,05	32,53	0,044
>80 godina	10,08	1,61	62,92	0,013
Ženski spol	0,83	0,38	1,82	0,639
EGFR (%)	1,02	1,01	1,03	0,045
EGFR intenzitet	1,08	0,44	2,63	0,870
HER3 intenzitet	0,88	0,44	1,75	0,705
Ki67	1,01	1,00	1,03	0,162
p53	1,00	0,99	1,01	0,690



Uloga HER obitelji receptora u nemelanomskim tumorima kože još uvijek je nedovoljno poznata, unatoč *in vitro* dokazanoj UV-posredovanoj izraženosti EGFR i HER2 (47,65,80). Dosadašnja istraživanja uglavnom su provedena u tumorima drugih organa. Članovi HER obitelji su do sada povezani s nastankom brojnih tumora uključujući tumore gastrointestinalnog, urinarnog, reproduktivnog trakta, tumore mozga, planocelularne karcinome (prvenstveno glave i vrata), karcinom dojke i želuca (10,12-15,46-50).

Cilj našeg istraživanja bio je pokušati istražiti njihovu ulogu u planocelularnom karcinomu kože.

U istraživanje je bilo uključeno 55 (54,46%) muškaraca i 46 (45,54%) žena, čija se dob kretala između 50 i 97 godina. Najviše bolesnika (N=44, odnosno 43,56%) bilo je u dobi između 71 i 80 godina. Većina lezija bila je smještena u predjelu glave i vrata (N=82, 61,19%). U ovom istraživanju pokazano je da je planocelularni karcinom češći u osoba muškog spola, starije dobi, te uglavnom nastaje na fotoeksponiranim predjelima kože, sukladno spoznajama drugih autora (3, 65-67).

Stoga se preporučuje provođenje redovitih *screening* pregleda u osoba starijih dobnih skupina.

U ispitivanoj skupini bili su zastupljeni slijedeći fototipovi kože (prema Fitzpatricku): 54 (53,47%) bolesnika bilo je fototipa II, dok je 47 (46,53%) bolesnika bilo fototipa kože III. Većina ispitanika (N= 93, 92,08%) je tijekom života bila izložena pojačanom UV zračenju. Tri ili više sunčevih opeklinu u djetinjstvu je imalo 40 (39,60 %) bolesnika.

Naime, i ovdje se radi o općepoznatim činjenicama da je planocelularni karcinom češći u osoba svjetlije fototipa koje su tijekom života bile izložene pojačanom UV zračenju i zadobile više od tri sunčeve opekline u djetinjstvu. Većoj incidenciji pridonosi način života (odijevanje, pojačano izlaganje UV zračenju, osobito trend odlazaka u salone za sunčanje), kao što je navedeno u uvodu (3,27). Preporučene preventivne mjere: mjere fotoprotekcije, edukacija opće populacije, osobito mlađih dobnih skupina, te naglašavanje štetnosti odlazaka u salone za sunčanje.

Analizom rezultata imunohistokemije u našem radu, utvrđene su statistički značajne razlike između planocelularnog karcinoma i zdrave kože u izraženosti EGFR, Ki67 te p53 (sve vrijednosti su značajno veće u karcinomu), što je sukladno rezultatima drugih autora (19-23, 67,72-74). HER 2 je bio negativan i u tumorima i zdravoj koži, dok je HER3 bio izražen jednako u tumoru i zdravoj koži.

Naše istraživanje pokazalo je veću izraženost EGFR u planocelularnom karcinomu u odnosu na zdravu kožu. Naime, u uzorcima planocelularnog karcinoma EGFR je bio pozitivan u 82% (N=109) uzoraka, dok je u svim uzorcima zdrave kože bio negativan. Malobrojna su dosadašnja istraživanja izraženosti EGFR u koži.

Krahn i suradnici istraživali su izraženost HER obitelji receptora (EGFR, HER2, HER3 i HER4) pojedinačno ali i njihovu ko-ekspresiju na ukupno 56 uzoraka koje su sačinjavali smrznuti uzorci zdrave kože, BCC i SCC. Smrznuti uzorci (N<sub>2</sub>, tekući dušik) iz 16 bazocelularnih karcinoma, 5 kožnih planocelularnih karcinoma i 16 uzoraka zdrave kože analizirani su konvencionalnom rt PCR metodom. Dobili su vrlo visoku izraženost EGFR u planocelularnom karcinomu kože (80%) u odnosu na zdravu kožu (38%). Dodatni uzorci koje su sačinjavala 4 uzorka zdrave kože, 9 bazocelularnih i 6 planocelularnih karcinoma analizirani su diferencijalnom rtPCR metodom za izraženost HER2 i kvantitativnom rt PCR metodom za EGFR i HER3. Ovom metodom su se EGFR, HER2 i HER3 mogli odrediti u svim uzorcima, pa makar bili prisutni i u vrlo maloj količini. Za EGFR i HER3 se jako pozitivnim rezultatom smatrao odnos RTK/GAPDH  $\geq 0,5$ . Takvih je za EGFR bilo 25% uzoraka zdrave kože, te 33% uzoraka BCC i SCC (47). Izraženost HER 4 nije utvrđena niti u jednom uzorku (47). U usporedbi s našim istraživanjem, slični rezultati su dobiveni u izraženosti EGFR. Naime, u njihovoj studiji izraženost je u planocelularnom karcinomu bila 80% metodom rt PCR, odnosno 33% kvantitativnom metodom rtPCR, dok je u našem istraživanju bila 82%. Razlika postoji u svim ostalim rezultatima. Naime, izraženost EGFR u zdravoj koži u našem istraživanju nije uočena, dok je u njihovom istraživanju zabilježena u 38% slučajeva metodom rt PCR, odnosno jaka izraženost u 25% slučajeva kvantitativnom metodom rtPCR (47). Kada je riječ o ko-ekspresiji, autori su u zdravoj koži utvrdili izoliranu izraženost HER2 ili ko-ekspresiju EGFR/HER2. U tumorskoj koži je pronađena koekspresija HER2/HER3 ili trostruka izraženost EGFR/HER2/HER3, koja je utvrđena u 50% BCC, 40% SCC u odnosu na 26% u zdravoj koži. U navedenom istraživanju postoji razlika u odnosu na naše istraživanje u broju uzoraka, koji je znatno veći u našem istraživanju, te u metodologiji (47).

Lavrijesen i suradnici istraživali su izraženost EGFR, involukrina i citokeratina u bazocelularnom i planocelularnom karcinomu kože. Dobili su u nemelanomskim tumorima kože (BCC i SCC) i u zdravoj koži jednaku izraženost EGFR u svim uzorcima (100%), dok u našem istraživanju nije bilo pozitiviteta u zdravoj koži, za razliku od uzoraka SCC gdje je pozitivitet detektiran u 82% uzoraka. Razliku možemo objasniti malim brojem uzoraka u njihovom istraživanju (14 SCC) u odnosu na naše (134 SCC), kao i uporabom smrznutih uzoraka dok smo mi koristili parafinske blokove. Korišteno je i različito protutijelo. Naime, dok smo mi koristili klon E30, oni su koristili 2E9. Iz rada nisu razvidni kriteriji korišteni u očitavanju rezultata, pa je moguće da su i tu postojale razlike u odnosu na naše istraživanje (61).

Schlauder i suradnici su istraživali izraženost EGFR na posebnom histološkom podtipu kožnog planocelularnog karcinoma vretenastih stanica (*cutaneous spindle squamous cell carcinoma*, SSC, inače također poznat kao sarkomatoidni karcinom). To je rijetka podvrsta planocelularnog karcinoma karakterizirana slabo diferenciranim atipičnim vretenastim stanicama koje fenotipski nalikuju mezenhimalnom tumoru. U istraživanju na 13 uzoraka primarnog nemetastatskog SSC kože, metodom imunohistokemije dobili su znatno manju izraženost EGFR (< 8%) u usporedbi s naših 82%. Razliku možemo prvenstveno objasniti vrlo malim uzorkom koji su koristili u svom istraživanju i specifičnim podtipom planocelularnog karcinoma (63).

Danas se smatra da je EGFR ključan u nastanku planocelularnog karcinoma kože (64). Aktivacija EGFR u keratinocitima dovodi do stanične proliferacije i povećanja debljine epidermisa i broja stanica, inducira ili blokira diferencijaciju keratinocita ovisno o eksperimentalnim uvjetima, dovodi do migracije normalnih keratinocita, te povećava preživljenje stanica i rezistenciju na apoptozu (5, 44,45). Povećana izraženost EGFR u tumorima dovodi do stanične proliferacije, preživljenja tumorskih stanica, invazije, angiogeneze i pojave metastaza. U planocelularnom karcinomu pojačana izraženost EGFR izgleda dovodi do pojave agresivnijeg fenotipa tumora (5). Većina istraživanja EGFR u karcinomima kože potvrđuje njegov značaj u nastanku tumora (47, 61, 62, 64, 67).

Naše istraživanje potvrđuje dosadašnje spoznaje o važnosti EGFR u nastanku planocelularnog karcinoma kože (81, 82). Najvjerojatniji mehanizam njegovog djelovanja u planocelularnom karcinomu kože upravo je njegovo djelovanje na proliferaciju keratinocita, blokadu njihove diferencijacije, povećanje preživljenja tumorskih stanica i rezistencije na apoptozu.

U istraživanjima nemelanomskih karcinoma kože HER2 je uglavnom povezan s regulacijom odgovora kože na UV zračenje, odnosno s UV uvjetovanom karcinogenezom (65,66). HER2 pozitivitet u našem istraživanju nije utvrđen u tumoru, što je sukladno rezultatima rada Schlaudera i suradnika(63). Također, HER2 pozitivitet nismo utvrdili niti u uzorcima zdrave kože. U istraživanju Krahn-a i suradnika HER2 izraženost je konvencionalnom metodom rt PCR zabilježena u 100% slučajeva zdrave kože i planocelularnog karcinoma. Metodom diferencijalne rt PCR medijan ekspresije za HER2 je bio u zdravoj koži 48,0, u BCC 31,6 te u SCC 41,4, što se sve smatralo jako pozitivnim rezultatom. Utvrđen je veći medijan ekspresije u zdravoj koži (48,0) u odnosu na SCC (41,4). Naprotiv, u našem istraživanju nije uočena izraženost HER2 niti u jednom uzorku. Razliku u odnosu na naše istraživanje možemo objasniti malim brojem uzoraka u njihovom istraživanju te primjenom različite metode. PCR je znatno osjetljivija metoda od imunohistokemije (IHC) koja je korištena u našem istraživanju. Mi smo također u očitavanju HER2 primijenili vrlo stroge kriterije, koji se koriste kod karcinoma dojke (47).

Ahmed i suradnici, su istraživali izraženost HER2 u uzorcima nekoliko različitih tumora kože: 5 keratoakantoma, 10 aktiničkih keratoza, 17 primarnih SCC, 7 metastatskih SCC, 10 BCC. Koristili su metodu sličnu našoj, naime IHC na parafinskim blokovima. Broj uzoraka SCC je bio znatno manji od našega (ukupno 24 u odnosu na naših 134), a zamijetili su visoku izraženost HER2 u uzorcima SCC (82% u primarnog SCC, te 86% u metastatskog SCC). Razlika prema našem istraživanju, osim veličinom uzorka, može se objasniti i kriterijima očitavanja HER2 imunoreaktivnosti. Naime, Ahmed i suradnici su pozitivnim smatrali uzorke kod kojih je >1% stanica pokazalo pozitivitet bilo kojeg inteziteta, dok smo mi pozitivnim smatrali >30% stanica koje pokazuju pozitivitet u intezitetu 3+ (83).

Spoznaje uloge HER2 u drugim karcinomima mogu biti korisne u njihovom proučavanju učinaka u karcinomima kože. Međutim, do sada uloga HER2 u nastanku karcinoma kože nije razjašnjena. Bit će potrebna nova istraživanja kako bi se ona rasvijetlila.

HER3 je u našem istraživanju bio jednako izražen u tumoru i zdravoj koži. Izraženost HER3 je u istraživanju Krahn-a i suradnika konvencionalnom metodom rt PCR u zdravoj koži bila 38%, a u SCC u 80% slučajeva, dok je kvantitativnom rtPCR metodom utvrđen veći postotak jako pozitivnih uzoraka u zdravoj koži (50%) u odnosu na SCC (17%). U našem istraživanju izraženost HER3 je zabilježena u 100% uzoraka i zdrave kože i SCC. Tu možemo reći da je donekle slična bila izraženost u SCC. U radu Krahn-a i suradnika na vidjelo izlazi spoznaja o važnosti primijenjene metode. Naime, kvantitativnom rtPCR metodom dobili su veći postotak jako pozitivnih uzoraka u zdravoj koži (50%) u usporedbi s SCC (17%), što se razlikuje od rezultata dobivenog konvencionalnom metodom rt PCR (47).

Wimmer i suradnici su proučavali izraženost HER3 na uzorcima različitih tumora kože, uključujući i SCC, te u zdravoj koži. Koristili su smrznute uzorke i PCR metodu. Pozitivitet su dobili u 80% slučajeva SCC, 27% uzoraka zdrave kože, te 68% u nevusima, dok smo mi dobili 100% pozitivitet u uzorcima SCC i zdrave kože. Ovim istraživanjem obuhvaćen je vrlo mali broj uzoraka SCC (5), pa navedeni rezultat nije prikladan za interpretaciju (50).

Nadalje, u istraživanju Wimmera i suradnika je zanimljivo da je ekspresija HER3 znatno jače izražena u malignih tumora kože, metastaza malignog melanoma, ali pozitivitet je u manjoj mjeri uočen i u benignim strukturama, kao što su nevusi, pa čak i u zdravoj koži (50).

Time je zapravo još uvijek nejasna uloga HER3 u nastanku karcinoma kože. Potrebne su nove studije, na većem broju uzoraka, kako bi se objasnila njegova uloga u tumorima kože.

Zaključno možemo reći da su najvažnije razlike koje su dovele do različitih rezultata između našeg i do sada objavljenih istraživanja HER-receptora u koži slijedeće:

- Razlika u veličini uzorka: sva navedena istraživanja imala su značajno manji broj uzoraka u odnosu na naše istraživanje.
- Različita metodologija je primijenjena u istraživanjima.
- Kriteriji očitavanja se razlikuju u istraživanjima koja su koristila istu ili sličnu metodu.

U tablici 21. prikazana je detaljna usporedba do sada objavljenih istraživanja obitelji HER-receptora u koži i našeg istraživanja.

**Tablica 21.** Usporedba do sada objavljenih istraživanja obitelji HER-receptora u koži i našeg istraživanja.

Autor i referenca	Dg	Br. IU	EGFR	HER2	HER3	Metodologija
<b>Krahn i sur. Eur J Cancer 2001(47)</b>	Z	16	6 (38%)	16 (100%)	6 (38%)	N2 smrznuti rt PCR
	BCC	16	9 (57%)	16(100%)	10 (63%)	
	SCC	5	4 (80%)	5 (100%)	4 (80%)	
	Z	4	25%	48,0 s	50%	dif. rt PCR (HER2) kvant. rt PCR (EGFR HER3)
	BCC	9	33%	31,6 s	56%	
	SCC	6	33%	41,4 s	17%	
<b>Ahmed i sur. Br Jour of Dermatol 1997 (83)</b>	KA	5		1 (20%)		Parafinski blokovi IHC
	AK	10		2 (20%)		
	SCCp	17		14 (82%)		
	SCCm	7		6 (86%)		
	BCC	10		5 (50%)		
<b>Lavrijesen i sur. Arch Dermatol Res. 1989 (61)</b>	Z	5	5 (100%)			smrznuti IHC
	BCC	19	19 (100%)			
	SCC	14	14 (100%)			
<b>Schlauder i sur. Am J Dermatopathol 2007 (63)</b>	SSCp	13	1 (< 8%)	0 (0%)		IHC
<b>Wimmer i sur. Anticancer Research 2008 (50)</b>	MMp	40			17 (42%)	Smrznuti rt PCR
	MMm	18			15 (83%)	
	LMM	2			2 (100%)	
	MCC	1			1 (100%)	
	BCC	16			10 (63%)	
	SCC	5			4 (80%)	
	Z	11			3 (27%)	
	SEBK	1			0 (0%)	
	N	22			15 (68%)	
<b>Naše istraživanje</b>	<b>Z</b>	<b>134</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>134(100%)</b>	<b>Parafinski blokovi IHC</b>
	<b>SCC</b>	<b>134</b>	<b>109 (82%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>134(100%)</b>	

Legenda:

Dg = dijagnoza; Br. IU= broj ispitivanih uzoraka; Z= zdrava koža; BCC (*basal cell carcinoma*= bazocelularni karcinom); SCC (*squamous cell carcinoma*= planocelularni karcinom);s (*strong* = jaka ekspresija) SCCp= primarni SCC; SCCm= metastatski SCC; SSC= SCC vretenastih stanica; KA= keratoakantom; AK= aktinička keratoza; MMp = primarni melanom; MMm= metastatski melanom; LMM= lentigo maligna melanom; MCC= Merkelov karcinom; SEBK= seboroička keratoza; N= nevus; IHC= imunohistokemija; rt PCR= konvencionalna polimeraza lančana reakcija (*polymerase chain reaction*, PCR) reverznom transkriptazom (rt); dif. rt PCR= diferencijalna rt PCR; kvant. rt PCR= kvantitativna rt PCR.



U našem istraživanju dobiveni su slijedeći rezultati izraženosti p53 i Ki67:

P53 je bio pozitivan u 55,7% (N=73) tumora. U svim uzorcima zdrave kože je bio negativan. Rezultat je sukladan rezultatima drugih autora (19-22).

Ki67 je bio pozitivan u 39,7% (N=52) tumora, dok je negativan bio u svim uzorcima zdrave kože. Slične rezultate istraživanja imali su i drugi autori (23, 75-78).

P53 i Ki67 su danas poznati i utemeljeni markeri tumorskog rasta i proliferacije. Upravo zbog toga u literaturi se i danas istražuju bilo samostalno ili kao kontrola u istraživanju nekih novih tumorskih markera (84, 85,86). Iz sličnog razloga smo ih i mi uključili u naše istraživanje.

U novije vrijeme proučavani su:

- U istraživanju planocelularnog karcinoma *in situ* i odnosa prema HPV genotipovima (87).
- U istraživanju novih markera u planocelularnim karcinomima kože (88).

Ki67 se osobito koristi u istraživanjima tkivne proliferacije (89), kao i razlike između proliferativne, preneoplastične i neoplastične kože. Prijelaz u invazivni fenotip je obilježen obrnutim odnosom između diferencijacije i proliferacije stanica, što korelira sa stupnjem histološke diferencijacije (90).

Rezultati našeg istraživanja sukladni su ranije spomenutima. Naime, veća izraženost p53 i Ki67 primijećena je u tumorskom u odnosu na zdravo tkivo.

U novije vrijeme pronađena je citoplazmatska/membranska reaktivnost na Ki67. Opisana je u trabekularnom adenomu tiroidne žlijezde, sklerozirajućem hemangiomu pluća i pleomorfnom adenomu žlijezda slinovnica. Faratian i sur., su je pronašli u 8% karcinoma dojke. Autori su pokazali da je ovaj tip Ki67 reaktivnosti značajno povezan s invazivnim karcinomom dojke, amplifikacijom HER2 i odsutnošću estrogenih receptora (ER) (24).

Plesan i sur. pronašli su citoplazmatsku/membransku reaktivnost u 2% slučajeva karcinoma dojke. Za sada se ne zna točan mehanizam citoplazmatske/membranske Ki67 reaktivnosti. Pronađena je uglavnom, prilikom korištenja jedne vrste protutijela (MIB-1), a pokušava se objasniti križnom reaktivnošću s drugim proteinima, artefaktom prilikom tehničke obrade ili relokacijom Ki67 u tijeku staničnog ciklusa (91).

U ovom istraživanju izraženost citoplazmatskog Ki67 pronađena je u samo jednom uzorku planocelularnog karcinoma.

Potrebne su daljnje studije kako bi se istražili funkcionalni oblici Ki67 i njegove lokalizacije *in vivo*.

Istraživanjem je utvrđena razlika u ekspresiji EGFR, Ki67 i p53 između solitarnog i multiplog SCC. Značajno veća izraženost zamijećena je u medijanima ekspresije u multiplim tumorima u odnosu na solitarne. Nije utvrđena razlika u izraženosti HER2 i HER3.

U do sada objavljenoj literaturi nije bilo istraživanja koja bi uspoređivala izraženost gore navedenih čimbenika u solitarnom u odnosu na multipli planocelularni karcinom kože. Međutim, dosadašnja istraživanja planocelularnih tumora drugih lokalizacija pokazala su da su EGFR, Ki67 i p53 uvijek bili povezani s malignijim fenotipom, što je sukladno s hipotezom našeg istraživanja (6,73,74,90).

EGFR je u našem istraživanju bio pozitivan u 90,91% (N=60) multiplih planocelularnih karcinoma, dok je u solitarnom karcinomu pozitivno bilo njih 73,13% (N=49). Radi se o statistički značajnoj razlici u korist izraženosti EGFR u multiplih tumora. Kako je i do sada u ranije navednim istraživanjima EGFR povezan s malignijim fenotipom, naš rezultat je sukladan s do sada objavljenim istraživanjima.

U našem istraživanju, a kako je i prikazano na slici 30, 50% (N=32) multiplih tumora pokazalo je pozitivitet na Ki67, u usporedbi s 29,85% (N=20) solitarnih planocelularnih karcinoma. Ponovno se radi o statistički značajnoj razlici u korist multiplih tumora. Kao što je već navedeno, veća izraženost Ki67 povezuje se s većom proliferacijom i slabijom diferencijacijom, a time i malignijim fenotipom tumora. Stoga je i logično da je jača ekspresija u multiplim tumorima. I ovdje se radi o potvrdi naše hipoteze.

U istraživanju smo uočili pozitivan nalaz proteina p53 u 64,62% (N=42) multiplih i 46,97% (N=31) solitarnih planocelularnih karcinoma. Usporedba je grafički prikazana na slici 31. Rezultat predstavlja statistički signifikantnu razliku u korist multiplih tumora. Ponovno se radi o rezultatu koji je prema hipotezi našeg istraživanja bio očekivan. Naime, u multiplih tumorima očekuje se maligniji fenotip i veća agresivnost tumora u odnosu na solitarni.

Istraživanjem je utvrđeno da EGFR (%) i HER3 intenzitet značajno pozitivno koreliraju s Ki67 i p53 u solitarnom tumoru, ali ne i u multiplim tumorima.

Na zdravoj koži nisu uočene promjene u intenzitetu i udjelu izraženosti pojedinih receptora i biljega tako da nije bilo moguće učiniti procjenu povezanosti.

Analizom rezultata istraživanja uočena je značajna razlika između pojedinih tipova kože u postotku izraženosti EGFR-a (veće vrijednosti u svjetlijem tipu kože). Navedeni rezultat upućuje na zaključak da jačina izraženosti EGFR ovisi o fototipu kože.

U našem istraživanju pronađeni su značajno veći medijani ekspresije EGFR-a i Ki67 u ispitanika koji su tijekom života bili izloženi pojačanom UV zračenju.

Rodust i suradnici su u svom preglednom radu zaključili da je za nastanak planocelularnog karcinoma kože od ključnog značenja poremećaj u kontroli programirane stanične smrti koja nastaje kao odgovor na nepopravljivo oštećenje DNA u stanicama izloženim UV zračenju. Poremećaj uključuje inaktivaciju "divljeg" p53, ali i aktivaciju EGFR, COX-2 i MAPK, što

dovodi do specifične regulacije Bcl-2 proteina, kao i liganada i receptora odgovornih za smrt stanice (92).

U studiji na transgeničnim miševima pojačano osjetljivim za nastanak karcinoma kože proučavan je stupanj do kojega UV-inducirana aktivacija EGFR utječe na nastanak tumora u koži. Miševima je prije izlaganja UV zračenju lokalno ili intraperitonejski apliciran inhibitor EGFR, AG1478. Inhibicija EGFR dovela je do smanjenja proliferacije stanica, povećane apoptoze i odgođene hiperplazije epidermisa nakon UV zračenja (93).

Galer i suradnici istraživali su utjecaj ciljane terapije na rast i preživljenje staničnih linija kožnog planocelularnog karcinoma nakon primjene IGF-IR (*anti-insulin-like-growth factor -I receptor*) protutijela, samog ili u kombinaciji s EGFR antitijelom cetuximabom, *in vitro* i *in vivo* na mišjem modelu. Liječenje s IGF-IR protutijelom i cetuximabom inhibiralo je proliferaciju i inducira apoptozu u planocelularnom karcinomu. Autori su zaključili da bi dvojno liječenje monoklonalnim protutijelima za EGFR i IGF-IR moglo biti korisno u liječenju kožnog planocelularnog karcinoma (94).

Rezultati našeg istraživanja upućuju na zaključak da je kod osoba koje su bile izložene pojačanom UV zračenju došlo do povećane izraženosti EGFR, koja je potom svojim učinkom na keratinocyte u vidu proliferacije, blokade diferencijacije, povećanja preživljenja tumorskih stanica i rezistencije na apoptozu pogodovala nastanku karcinoma. Ki67 je kao biljeg proliferacije također bio povećan, što samo potvrđuje našu hipotezu.

Sukladno podacima prikazanim u tablici 17, pronađeni su značajno veći medijani ekspresije EGFR-a u ispitanika koji su tijekom života imali više od tri opekline uzrokovane sunčevim zračenjem.

Navedeno je sukladno s dosadašnjim spoznajama o ulozi UV zračenja na aktivaciju receptora tirozin kinaze (66,67).

Međutim, nismo zamijetili povišenu izraženost HER2. Moguće je da je razlog prolazna aktivacija HER2 nakon izloženosti UV zračenju, što je pokazano u istraživanju Madsona i suradnika (65).

Na temelju toga možemo zaključiti da je aktivacija HER2 zapravo rani i prolazni događaj u procesu nastanka planocelularnog karcinoma. To bi moglo biti i objašnjenje činjenice da su istraživanja provedena neposredno nakon izlaganja UV zračenju dala pozitivne nalaze izraženosti HER2, dok se u našem istraživanju na već nastalom planocelularnom karcinomu ova povezanost nije utvrdila.

Analizom dobivenih rezultata istraživanja, uz pomoć regresijskog modela predikcije stupnja tumora kao jedini značajni prediktor se izdvaja izraženost Ki67. Veća izraženost ovog biljega proliferacije povezana je s većim patohistološkim stupnjem tumora.

Rezultat našeg istraživanja sukladan je podacima iz literature, odnosno navodom da visoki Ki67 korelira s lošijom prognozom te ranijim recidivima tumora (23). Ki67 se osobito koristi u istraživanjima tkivne proliferacije (89). Prijelaz u invazivni fenotip obilježen je obrnutim

odnosom između diferencijacije i proliferacije stanica, što korelira sa stupnjem histološke diferencijacije (90).

Binarni logistički model predikcije rizika nastanka multiplih tumora je statistički značajan ( $P=0,039$ ) i objašnjava 17% varijance.

Najjači značajni prediktor nastanka multiplih tumora (kontroliran na ostale varijable u modelu) je starija dob (OR od 5,83 do 10,08 u usporedbi s referentnom skupinom mlađih od 60 godina), a nakon toga veća izraženost EGFR (%) (OR=1,02; 95% CI 1,01-1,03).

Ovi podaci upućuju na to da bi aktivnosti u ranom otkrivanju multiplih tumora trebale biti usmjerene na stariju dobnu skupinu i to prvenstveno nakon 70. godine života.

Činjenica je da oko 5% planocelularnih karcinoma kože metastazira. Rizični planocelularni karcinomi metastaziraju i u većem postotku (15% do 38%) (4, 95,96).

Imunosuprimirani bolesnici, osobito oni nakon transplantacije solidnih organa, prvenstveno srca, potom bubrega a manje jetre, imaju znatno veći rizik za nastanak planocelularnog karcinoma kože. Osobito agresivne i recidivirajuće planocelularne karcinome kože razvijaju bolesnici s kroničnom limfocitnom leukemijom (4, 8, 97,98).

Lijekovi koje ovi bolesnici uzimaju prije svega u cilju prevencije odbacivanja organa (imunosupresivi) s druge strane povećavaju rizik razvoja novih tumora, u ovome slučaju planocelularnih karcinoma kože (29).

Danas se u liječenju tumora pokušava primijeniti tzv. *tailored therapy*, kad god je to moguće. Radi se o što preciznije “skrojenom” lijeku za točno određenu bolest, po mogućnosti i za točno određenu skupinu bolesnika (personalizirana medicina).

Inhibitori HER receptora već su dulje vrijeme u uporabi. Najčešće se upotrebljavaju u kombinaciji s citostatskom terapijom. Istraživanja o novim aspektima njihovog djelovanja, novim kombinacijama s drugim načinima liječenja su u tijeku osobito u karcinomu dojke, karcinomu pluća ne-malih stanica te uznapređovalog planocelularnog karcinoma glave i vrata (99-102).

U liječenju melanoma se također kao moguća nova terapijska strategija istražuju inhibitori EGFR (103).

Za liječenje uznapređovalih planocelularnih karcinoma kože malo je terapijskih mogućnosti. EGFR je prva molekula za koju su proizvedena monoklonalna protutijela u cilju terapije raka. Farmakološki inhibitori EGFR puta nastanka tumora mogu predstavljati učinkovitu strategiju u blokiranju rasta tumora (104).

Postoje istraživanja o sustavnoj uporabi inhibitora EGFR u planocelularnom karcinomu kože u njihovoj standardnoj preporučenoj dozi. Proučavaju se i kombinacije s drugim načinima liječenja poput radioterapije, citostatske terapije ili blokatora ciklooksigenaze-2 (105).

Dokazi o učinkovitosti u liječenju planocelularnog karcinoma kože danas postoje za cetuximab (monoklonalno protutijelo za EGFR) (106).

Najveći problem u interpretaciji rezultata liječenja je zapravo nepostojanje većeg broja velikih studija. Najčešće postoje prikazi pojedinačnih slučajeva koji su uspješno liječeni inhibitorima EGFR.

U tijeku su studije koje proučavaju i druge inhibitore EGFR: erlotinib u monoterapiji ili neoadjuvantnoj primjeni prije definitivnog kirurškog ili radioterapijskog liječenja, gefitinib u kombinaciji s radioterapijom te panitumumab (105). Od njih se očekuje da rasvijetle stvarne mogućnosti uporabe ovih lijekova u cSCC, te daju uvid u nuspojave takvog liječenja.

Bolesnici za koje bi navedeni oblici liječenja mogli biti korisni u prvom redu su bolesnici na imunosupresivnoj terapiji, s agresivnim oblicima planocelularnog karcinoma kože, bolesnici s metastatskim i lokalno uznapredovalim planocelularnim karcinomom kože, te oni kod kojih kirurško ili radioterapijsko liječenje nije dalo očekivane rezultate ili više nije moguće.



- Analizom rezultata imunohistokemije u našem radu, utvrđene su statistički značajne razlike između planocelularnog karcinoma i zdrave kože u izraženosti EGFR, Ki67 te p53 (sve vrijednosti su značajno veće u karcinomu).  
Navedeni rezultati upućuju na zaključak da EGFR, Ki67 i p53 imaju značajnu ulogu u nastanku planocelularnog karcinoma kože.
- U našem istraživanju pronađeni su značajno veći medijani ekspresije EGFR-a i Ki67 u ispitanika koji su tijekom života bili izloženi pojačanom UV zračenju. Nameće se zaključak da UV zračenje dovodi do indukcije EGFR i Ki67, a time i nastanka planocelularnog karcinoma kože.
- Utvrđena je veća izraženost EGFR, Ki67 i p53 u multiplim tumorima u odnosu na solitarne, što bi moglo govoriti u prilog tvrdnjama da su EGFR, Ki67 i p53 povezani s malignijim fenotipom.
- Kao jedini značajni prediktor patohistološkog stupnja izdvaja se izraženost Ki67. Veća izraženost ovog biljega proliferacije povezana je s većim patohistološkim stupnjem tumora. Možemo zaključiti da je visoki stupanj izraženosti Ki67 pokazatelj invazivnosti tumora.
- Najjači značajni prediktor nastanka multiplih tumora (kontroliran na ostale varijable u modelu) je starija dob, a nakon toga veća izraženost EGFR (%). Ovi podaci upućuju na to da bi smjernice u ranom otkrivanju multiplih tumora trebale biti usmjerene na stariju dobnu skupinu i to prvenstveno nakon 70. godine života.





**Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze, faktora proliferacije Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože.**

Planocelularni karcinom kože (cSCC) drugi je po učestalosti maligni tumor epitela kože i sluznica. HER signalni putevi igraju važnu ulogu u biologiji nastanka raka, njihova deregulacija dovodi do rasta i rasapa tumorskih stanica.

Osnovna hipoteza rada bila je: očekuje se veća izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze (EGFR, HER2 i HER3), biljega Ki67 i proteina p53 u cSCC u odnosu na zdravu kožu, te u osoba s multiplim tumorima.

Primarni cilj našeg rada bio je usporediti izraženost EGFR, HER2 i HER3, biljega Ki67 i proteina p53 u cSCC u odnosu na zdravu kožu. Ispitivana skupina je obuhvatila 101 bolesnika kod kojih je utvrđeno 134 planocelularnih karcinoma kože, različitog patohistološkog stupnja određenog prema Brodersovoj klasifikaciji. Kontrolnu skupinu činila su 134 uzorka zdrave peritumorske kože istih bolesnika, obrađenih u ispitivanoj skupini.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su statistički značajno veću izraženost receptora EGFR, biljega proliferacije Ki67 i proteina p53 u tumorskoj u odnosu na zdravu kožu, kao i u multiplim tumorima u odnosu na solitarne. Možemo zaključiti da EGFR, Ki67 i p53 imaju važnu ulogu u nastanku cSCC, te su povezani s malignijim fenotipom.

Rezultati ovog istraživanja mogli bi imati kliničke implikacije u smislu praktične primjene inhibitora EGFR u bolesnika s agresivnim oblicima cSCC.



## **Expression of transmembrane receptors of tyrosine kinase, proliferation marker Ki67 and protein p53 in cutaneous squamous cell carcinoma**

**Daniela Ledić Drvar, Zagreb, 2014**

Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most common skin cancer. HER pathways play a key role in cancer biology, their dysregulation leads to growth and spread of tumour cells. Main hypothesis of the study was: higher expression of transmembrane receptors of tyrosine kinase (EGFR, HER2 and HER3), proliferation marker Ki67 and protein p53 is expected in cSCC compared to normal skin, and in multiple tumours.

Primary objective of our investigation was to compare expression of EGFR, HER2 and HER3, proliferation marker Ki67 and protein p53 in cSCC and normal skin.

Investigated group included 101 patient with 134 cSCC of different patohistology stage according to Broders classification. Control group included 134 samples of normal skin of the same patients analyzed in investigated group.

Results of our investigation showed significantly higher expression of EGFR receptors, Ki67 and protein p53 in tumour compared to normal skin, as well as in multiple compared to solitar tumours. The above mentioned results led to conclusions that EGFR, Ki67 and p53 have a key role in cSCC development and that they are related to malignant phenotype. Results of this study could lead to EGFR inhibitors implementation in treatment of patients with aggressive cSCC.



1. Hanah D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
2. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Guguć D, Krajina Z, ur. Klinička onkologija. Medicinska naklada Zagreb 2013;str. 1-13.
3. Grossman D, Leffell DJ. Squamous Cell Carcinoma. U: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7. izd. ur: Wolff K, Goldsmith LA, Katz, SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. 2008 McGraw-Hill:Chapter 114: 1028-36.
4. Nuno-Gonzales A, Vincente-Martin FJ, Pinedo-Moraleda F, Lopez-Esterbanz JL. High-Risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Actas Dermosifiliogr* 2012;103 (7):567-78.
5. Uribe P, Gonzales S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: Molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract* 2011;207:337-42.
6. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg* 2002; 28:268-73.
7. Czarnecki i sur. Metastases from squamous cell carcinoma of the skin in southern Australia. *Dermatology* 1994; 1:52-4.
8. de Koning MN, Weissenborn SJ, Abeni D i sur. Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J Gen Virol* 2009;90:1611-21.
9. Sliwkowski MX. U: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, ur. Diseases of the Breast, 3.izd. Philadelphia, PA: Lippincott Williams &Wilkins;2004:415-26.
10. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001;8(1):11-31.
11. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 2000;182(2):150-62.
12. Edwards J, Traynor P, Munro AF, Pirret CF, Dunne B, Bartlett JM. The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(1):123-30.
13. Ejskjaer K, Sørensen BS, Poulsen SS, Forman A, Nexø E, Mogensen O. Expression of the epidermal growth factor system in endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2007;104(1):158-67.

14. Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J i sur. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. *J Clin Pathol* 2006;59(6):631-4.
15. Baker CH, Pino MS, Fidler IJ. Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells in human renal cell carcinoma is a primary target for therapy by tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* 2006;8(6):470-6.
16. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C i sur. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;12(3):541-52.
17. Baselga J. A new anti-ErbB2 strategy in the treatment of cancer: prevention of ligand-dependent ErbB2 receptor heterodimerization. *Cancer Cell* 2002; 2(2):93-5.
18. Sergina NV, Rausch M, Wang D i sur. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445(7126):437-41.
19. Weinberg RA. P53 and Apoptosis: Master Guardian and Executioner. U: *The biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007; str. 307-56.
20. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 2003; 21 (3): 217-28.
21. Moch C, Moysan A, Lubin R i sur. Divergence between the high rate of p53 mutations in skin carcinomas and the low prevalence of anti-p53 antibodies. *Br J Cancer* 2001;85 (12):1883-6.
22. Erb P, Ji J, Kump E, Mielgo A, Wernli M. Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008;624:283-95.
23. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Guguć D, Krajina Z, ur. *Klinička onkologija*. Medicinska naklada Zagreb 2013; str. 43-8.
24. Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JMS. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. *Histopathology* 2009;54:254-57.
25. Dobrić I, Radoš J. Maligni epitelni tumori, prognostički nedovoljno jasne promjene koje se (ponegdje) klasificiraju kao verukozni karcinom te rjeđi oblici karcinoma kože i metastatski karcinomi kože. U: Dobrić I. i suradnici. *Dermatovenerologija*. Grafoplast Zagreb 2005; str. 395-403.
26. Sterry W, Stockfleth E. Malignant Epithelial Tumors. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, ur. *Braun-Falco's Dermatology*. 3rd Ed. Berlin: Springer Verlag, 2009; str.1357-76.
27. Schulman JM, Fisher DE. Indoor ultraviolet tanning and skin cancer: health risks and opportunities. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(2):144-9.
28. Gallagher RP, Lee TK, Bajdik CD, Borugian M. Ultraviolet radiation. *Chronic Dis Can* 2010;29 Suppl 1:51-68.

29. Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 2012;122 (2):464-72.
30. Kubo Y i sur. p53 gene mutations in human skin cancers and precancerous lesions comparison with immunohistochemical analysis. *J Invest Dermatol* 1994;102 (4):440-4.
31. Ziegler A i sur. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994;372 (6508):773-6.
32. Nelson MA i sur. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett* 1994;85(1):23-9.
33. Cutaneous squamous cell carcinoma and other cutaneous carcinomas. U: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al, ur : *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, N: Springer, 2010, str 301-14.
34. Zalaudek I, Giacomel J, Schmid K i sur. Dermatoscopy of facial actinic keratosis, intraepidermal carcinoma and invasive squamous cell carcinoma: a progression model. *J Am Acad Dermatol* 2012;66 (4):589-97.
35. Celić D. Carcinoma spinocellulare. U: Lipozenčić J, Pašić A i sur. *Dermatološka onkologija*, Medicinska naklada – Zagreb 2009, str. 61-73.
36. Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 2008;314:3093-106.
37. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA i sur. Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712.
38. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003;284: 99-110.
39. Lewis GD, Lofgren JA, McMurtrey AE i sur. Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res* 1996;56:1457-65.
40. Campiglio M, Ali S, Knyazev PG, Ulrich A. Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer. *J Cell Biochem* 1997;73:522-32.
41. Hynes NE, Stern DF. The biology of ErbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1198:165-84.
42. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol* 2006;16:649-56.
43. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. *EMBO J* 2000;19:3159-67.

44. Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor – an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol* 2000;10(7):505-10.
45. Rodeck U i sur. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 1997; (110, Pt2):113-21.
46. Koumakpayi IH, Diallo JS, Le Page C i sur. Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:2730-7.
47. Krahn G, Leiter U, Kaskel P, Utikal J, Bezold G, Peter RU. Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer. *Eur J Cancer* 2001;37 (2):251-9.
48. Bei R, Pompa G, Vitolo D, Moriconi E, Ciocci L, Quaranta M i sur. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001;195:343-8.
49. Palmieri G, Ascierto PA, Cossu A, Colombino M, Casula M, Botti G i sur. Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases. *Melanoma Res* 2003;13:167-70.
50. Wimmer E, Kraehn-Senftleben G, Issing WJ. HER3 expression in cutaneous tumors. *Anticancer Res* 2008;28:973-80.
51. Jackson-Fisher AJ, Bellinger G, Shum E i sur. Formation of Neu/ErbB2-induced mammary tumors is unaffected by loss of ErbB4. *Oncogene* 2006;25:5664-72.
52. Seth RM, Burger AM, Kahn HJ. Analysis of the HER2/neu gene amplification in microdissected breast cancer tumour samples. *Anticancer Re* 2006;26:927-31.
53. Bodey B, Bodey B Jr, Groger AM i sur. Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB2 and c-erbB3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas. *Anticancer Res* 1997;17:1319-30.
54. Peris K, Cerroni L, Chimenti S, Soyer HP, Kerl H, Hofler H. Proto-oncogene expression in dermal naevi and melanomas. *Arch Dermatol Res* 1991;283:500-5.
55. Lee JW, Soung YH, Seo SH i sur. Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal and breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:57-61.
56. Bei R, Budillon A, Masuelli L i sur. Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol* 2004; 204:317-25.
57. Shigematsu H, Gazdar AF. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer* 2006;118:257-62.
58. Memon AA, Sorensen BS, Melgrad P, Fokdal L, Thykjaer T, Nexø E. Expression of HER3, HER4 and their ligand heregulin-4 is associated with better survival in bladder cancer patients. *Br J Cancer* 2004;91:2034-41.



59. Weinberg RA. Growth Factors, Receptors, and Cancer. U: The biology of Cancer. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007, str.119-58.
60. Lee CM, Shrieve DC, Zempolich KA i sur. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated AKT (P-AKT), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2005; 99(2):415-21.
61. Lavrijsen AP, Tieben LM, Ponc M, van der Schroeffer JG, van Muijen GN. Expression of EGF receptor, involucrin and cytokeratins in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of the skin. *Arch Dermatol Res* 1989;281(2):83-8.
62. Rittie L, Kansra S, Stoll SW i sur. Differential ErbB1 singaling in squamous cell versus basal cell carcinoma of the skin. *Am J Pathol* 2007; 170(6):2089-99.
63. Schlauder SM, Calder KB, Moody P, Morgan MB. HER2 and EGFR Expression in Cutaneous Spindle Squamous Cell Carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2007;29(6): 559-63.
64. Yamamoto T, Kamata N, Kawano H i sur. High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Research* 1986;46:414-6.
65. Madson JG, Lynch DT, Tinkum KL, Putta SK, Hansen LA. Erbb2 regulates inflammation and proliferation in the skin after ultraviolet irradiation. *Am J Pathol* 2006;169(4):1402-14.
66. Madson JG, Hansen LA. Multiple mechanisms of Erbb2 action after ultraviolet irradiation of the skin. *Mol Carcinog* 2007;46(8):624-8.
67. Xu J, Shao Y, Zhou J, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. *J Cell Biochem* 2009;107(5):873-80.
68. Roshan A, Jones PH. Chronic low dose UV exposure and p53 mutation: tilting the odds in early epidermal preneoplasia? *Int J Radiat Biol* 2012; 88(10):68-7.
69. Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina, V, Gariglio, P. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805(1):6-16.
70. Nindl I, Rosl F. Molecular concepts of virus infections causing skin cancer in organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2008;8:2199-204.
71. Jafarnejad SM, Li G. Regulation of p53 by ING family members in suppression of tumor initiation and progression. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31(1-2):55-73.
72. Bukhari MH, Niazi S, Chaudry NA. Relationship of immunohistochemistry scores of altered p53 protein expression in relation to patient's habits and histological grades and stages of squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2009;36:342-9.

73. Johnson J, Lagowski J, Lawson S, Liu Y, Kulesz-Martin M. P73 expression modulates p63 and Mdm2 protein presence in complex with p53 family-specific DNA target sequence in squamous cell carcinogenesis. *Oncogene* 2008;27:2780-7.
74. Sakiz D, Turkmenoglu TT, Kabukcuoglu F. The expression of p63 and p53 in keratoacanthoma and intraepidermal and invasive neoplasms of the skin. *Pathology-Research and Practice* 2009;205:589-94.
75. Leong AS, Zhuang Z. The Changing Role of Pathology in Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Pathobiology* 2011;78(2):99–114.
76. Viale G. Pathological work up of the primary tumor: getting the proper information out of it. *Breast* 2011;20 Suppl 3:S82-6.
77. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 2010;17(4):R245-62.
78. Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology* 2013;84(4):219-25.
79. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990;1(3):199-206.
80. Huang RP, Wu JX, Fan Y, Adamson ED. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol* 1996;133: 211-20.
81. Commandeur S, van Drongelen V, de Gruijl FR, El Ghalbzouri A. Epidermal growth factor receptor activation and inhibition in 3D in vitro models of normal skin and human cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2012;103(12): 2120-6.
82. Suomela S, Elomaa O, Skoog T i sur. CCHCR1 is up-regulated in skin cancer and associated with EGFR expression. *PLoS One* 2009 Jun 24;4(6):e6030.
83. Ahmed NU, Ueda M, Ichihashi M. Increased level of c-erbB-2/neu/HER-2 protein in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 1997;136:908-12.
84. Khodaeiani E, Fakhrjou A, Amirnia M i sur. Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki67 expression in skin epithelial tumors. *Indian J Dermatol* 2013;58(3):181-7.
85. Talghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of p27, Ki67 and p53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci* 2009;12(12):929-33.
86. Agulnik M, da Cunha Santos G, Hedley D i sur. Predictive and pharmacodynamic biomarker studies in tumor and skin tissue samples of patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck treated with erlotinib. *J Clin Oncol* 2007;25(16):2184-90.

87. Sanchez-Hernandez M, Conesa-Zamora P, Garcia-Solano J, Corbalan-Velez R, Martinez-Barba E, Perez-Guillermo M. Expression profiles of ProEx C and Ki67 in squamous cell carcinoma in situ of the skin and their relationship with human papillomavirus genotypes. *J Cutan Pathol* 2010;37(7):730-6.
88. Zhang J, Wang J, Chen L i sur. Expression and function of NET-1 in human skin squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol Res* Doi 10.1007/s00403-013-1423-9. Published online: 07 November 2013.
89. Bacchi CE, Gown AM. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res* 1993;26(7):677-87.
90. Caldwell CJ, Hobbs C, McKee PH. The relationship of Ki67 and involucrin expression in proliferative, preneoplastic and neoplastic skin. *Clin Exp Dermatol* 1997;22(1):11-6.
91. Plesan DM, Georgescu CV, Patrana N, Plesan C, Stoica D. Immunohistochemical study of p53 and Ki67 in a group of patients with mammary carcinoma. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2010;51(3):459-65.
92. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV-induced squamous cell carcinoma-a role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol* 2009;161 Suppl 3:107-15.
93. El-Abaseri TB, Fuhrman J, Trempus C, Shendrik I, Tennant RW, Hansen LA. Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2005;65(9):3958-65.
94. Galer CE, Corey CL, Wang Z i sur. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor I: reduction of angiogenesis and tumor growth in cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011;33(2):189-98.
95. Garcia-Zuazaga J, Olbricht SM. Cutaneous squamous cell carcinoma. *Adv Dermatol* 2008;24:33-57.
96. Oddone N, Morgan GJ, Palme CE i sur. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: the Immunosuppression, Treatment, Extranodal spread, and Margin status (ITEM) prognostic score to predict outcome and the need to improve survival. *Cancer* 2009;115:1883-91.
97. Weinberg AS, Ogle CA, Shim EK. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma: an update. *Dermatol Surg* 2007;33:885-99.
98. Jennings L, Schmults D. Management of high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Aesthetic Dermatol* 2010;3:39-48.
99. Bilancia D, Rosati G, Dinota A, Germano D, Romano R, Manzione L. Lapatinib in breast cancer. *Ann Oncol* 2007 Jun;18 Suppl 6:vi26-30.

100. Janne PA, Boss DS, Camidge DR i sur. Phase I dose-escalation study of the pan-HER inhibitor, PF 299804, in patients with advanced malignant solid tumors. *Clin Cancer Res* 2011;17(5):1131-9.
101. Del Campo JM, Hitt R, Sebastian P i sur. Effects of lapatinib monotherapy: results of a randomised phase II study in therapy-naïve patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 2011;105(5):618-27.
102. Bonner JA i sur. Radiotherapy plus cetuximab for squamous- cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354(6):567-578.
103. Djerf EA, Trinks C, Abdiu A, Thunell LK, Hallbeck AL, Walz TM. ErbB receptor tyrosine kinases contribute to proliferation of malignant melanoma cells: inhibition by gefitinib (ZD1839). *Melanoma Res* 2009;19(3):156-66.
104. Khan MH, Alam M, Yoo S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg* 2011;37(9):1199-209.
105. Alter M, Satzger I, Mattern A, Knapp A, Gutzmer R. Treatment of advanced cutaneous squamous cell carcinomas with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Dermatology* 2013;227:289-94.
106. Wollina U. Update of cetuximab for non-melanoma skin cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14(2):271-6.



Rođena sam 6.6.1965. u Banjaluci, Bosna i Hercegovina, gdje sam završila osnovnu školu i Gimnaziju.

Na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 1990. s prosječnom ocjenom 4,41. Stručni ispit položila sam 1991, nakon čega sam radila kao liječnik opće prakse u Ustanovi za hitnu medicinsku pomoć grada Zagreba, te domovima zdravlja u Čazmi i Našicama.

U razdoblju od 1995-2004 bila sam zaposlena u farmaceutskoj industriji. Bila sam osnivač i voditelj predstavništva tvrtke Wyeth, odgovorna za kompletno poslovanje u Republici Hrvatskoj.

Od 2004. do 2008. sam specijalizirala dermatologiju i venerologiju, te završila stručni poslijediplomski studij.

Od 2009. radim na Klinici za dermatovenerologiju, KBC Zagreb. Užu specijalizaciju iz dermatološke onkologije zapačela sam u veljači 2013.

Doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2008 g.

2010. obranila sam temu doktorske disertacije pod nazivom: Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze, faktora proliferacije Ki67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože.

Do sada sam objavila više radova u međunarodno citiranim časopisima, autor i koautor sam brojnih sažetaka s međunarodnih skupova, te nekoliko poglavlja u udžbenicima.

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog dermatovenerološkog društva, Europske akademije za dermatologiju i venerologiju, te Internacionalnog dermoskopskog društva.

## UPITNIK

za znanstveno istraživanje:

**“Izraženost transmembranskih receptora tirozin kinaze, faktora proliferacije Ki 67 i proteina p53 u planocelularnom karcinomu kože“**

**Ime i prezime ispitanika:**

**Broj ispitanika:**

**Dob:**

**Spol:** M,Ž

**Boja očiju:** plava; zelena; smeđa; crna

**Boja kose:** plava; crvena; smeđa; crna

**Fototip kože:** I, II, III, IV, V, VI

**Zanimanje:** na otvorenom; na zatvorenom

**Pojava sunčanih opeklin u djetinjstvu:** ne; da, koliko puta \_\_\_\_\_

**Boravak u područjima s dugotrajnom insolacijom u djetinjstvu:** ne, da, gdje i koliko \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Uporaba fotoprotektivnih sredstava tijekom života:** ne; da

**Obiteljska anamneza za karcinome kože:** ne; da: tko u obitelji \_\_\_\_\_

**Osobna anamneza za karcinom kože:** ne, da: vrsta \_\_\_\_\_

**Sadašnja bolest:**

1. Klinička dg: \_\_\_\_\_
2. Veličina promjene (cm): \_\_\_\_\_
3. Lokalizacija: \_\_\_\_\_
4. Broj tumorskih promjena: \_\_\_\_\_
5. Patohistološka dijagnoza: \_\_\_\_\_
6. Patohistološki stadij:    I        II        III        IV

**Datum:**

**Potpis sudionika**

**Ime i prezime sudionika:**

**Potpis voditelja istraživanja:**

**Dr. Daniela Ledić Drvar**